



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Porfirinas nanoencapsuladas obtidas por ultra-som *spray drying*”

PRISCILLA PAIVA LUZ

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Porfirinas nanoencapsuladas obtidas por ultra-som *spray drying*”

PRISCILLA PAIVA LUZ

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Antonio Serra

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Luz, Priscilla Paiva

Porfirinas nanoencapsuladas obtidas por ultra-som
spray drying, Ribeirão Preto, 2008.

178 p.: 77 il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e
Letras Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Serra, Osvaldo Antonio.

1. Porfirina. 2. Nanoencapsulação. 3. *Spray Drying*. 4.
Sistema carregador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscilla Paiva Luz

Porfirinas nanoencapsuladas obtidas por ultra-som *spray drying*.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Química.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Simone (em memória) por toda dedicação e amor. Sua ausência me faz muita falta e não posso abraçá-la em agradecimento. Sei o quanto batalhou para que este momento chegasse e imagino como seria a sua felicidade agora. Tudo o que eu posso fazer é dizer muito obrigada.

“Nunca se esqueça, nem um segundo, que eu tenho o amor maior do mundo. Como é grande o meu amor por você”.

Ao meu pai Elcio, por me ensinar o gosto pela leitura. Um homem extremamente honesto, trabalhador e amigo. É um exemplo para mim. Os meus sinceros agradecimentos por todo apoio e sacrifício despendido para financiar os meus estudos, permitindo que eu alcançasse os meus objetivos. Amo você e muito obrigada.

Às minhas irmãs Patrícia e Cristine pelo carinho, amizade e por tudo o que fizeram pelos nossos pais e por mim.

Aos meus cunhados Ricardo e Osvaldo e aos meus sobrinhos Fernanda, Rodrigo, Victor e Leandro pelo carinho, companhia e brincadeiras.

Ao meu namorado Diego, minha eterna gratidão pela paciência e compreensão com as minhas várias horas de estudo. Um companheiro fiel e que sempre me incentiva buscar novos horizontes. É o meu melhor amigo, meu porto seguro e o grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Osvaldo Antonio Serra por ter me acolhido em seu laboratório, pela amizade e orientação.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Terras Raras: Ana Paula, Anderson, Ariane, Cinara, Cláudio, Edimar, Janaína, Juliana, Lívia, Luciano, Marquinhos, Miguel, PC, Perê, Simone e Vinícius, pelos vários anos de boa convivência, conversas produtivas e muitas risadas.

À Prof^a Yassuko e a todos os amigos do laboratório de Bioinorgânica: Chico, Mané, Heide, Kleber, Looser, Lucas, Luciana, Maria Elisa, Rebeca e Tati.

À minha amiga Fer pela imensa amizade, pelas festas, pelos momentos felizes e pelo inesquecível apoio nos momentos difíceis.

À minha amiga Chris pela companhia nos congressos, pelos “pedalas”, e pela grande amizade desde os tempos de graduação.

À minha mais “nova” amiga Ana Cecília pela valiosa ajuda no encerramento deste trabalho, pelas risadas e pelos bons momentos.

Aos meus amigos Edson, Flávia, Marco e Sergio por todo carinho e eterna amizade.

Ao Rodrigo pela amizade, análises de MEV e revisão de artigos.

À Prof^a. Ana Maria Pires, pelas sugestões e discussões no início deste doutorado.

À Prof^a. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli e sua doutoranda Thatyane, pela disponibilidade dos equipamentos, auxílio nos estudos e produção dos filmes Langmuir-Blodgett.

Ao professor Antonio Cláudio Tedesco pelas sugestões durante o Exame de Qualificação e suas doutorandas Andreza e Patrícia pelos experimentos de citotoxicidade e fotocitotoxicidade.

Ao Prof. Luis Alexandre Pedro de Freitas pelas sugestões durante o Exame de Qualificação.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de doutorado direto concedida.

*"Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha
amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha
amarela o próprio sol."*

Pablo Picasso

RESUMO

Luz, P. P. **Porfirinas nanoencapsuladas obtidas por ultra-som *spray drying***. 2008. 178p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Neste trabalho realizamos, inicialmente, o desenvolvimento de um *spray dryer* de baixo custo para ser utilizado nos experimentos de encapsulação por *spray drying*. A dextrina foi empregada como matriz polimérica nos experimentos de desenvolvimento deste equipamento por ser um polímero biocompatível, biodegradável, hidrofílico e economicamente viável. A integridade da dextrina nanoparticulada, obtida após o processo *spray drying*, foi verificada por análise térmica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) e o sucesso do equipamento para a produção de partículas esféricas foi atestado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após projetarmos a configuração final do *spray dryer*, os estudos de encapsulação em nanoesferas poliméricas foram iniciados com o estabelecimento de uma metodologia de encapsulação. O polímero utilizado nesta etapa como agente encapsulante foi a dextrina e os materiais ativos empregados foram a 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina (TPPS₄) e a manganês(III) 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina (MnTPPS₄), ambos hidrossolúveis. A metaloporfirina foi incorporada no trabalho com o intuito de utilizar o íon metálico como sonda espectroscópica, possibilitando a detecção da mesma nas partículas. Uma vez desenvolvida a metodologia de encapsulação, passamos a utilizar a quitosana como matriz polimérica e a 5, 10, 15, 20-tetra(N-metil-4-piridil) porfirina (TMPyP) como material

ativo. A citotoxicidade e a fotocitotoxicidade das nanoesferas de quitosana e da TMPyP livre e encapsulada em quitosana foram verificadas através de estudos envolvendo cultura de células da linhagem neoplásica de macrófagos J774-A1. Além destes estudos, a aplicabilidade da quitosana como veículo carregador para Terapia Fotodinâmica também foi estudada a partir da interação da TMPyP com monocamadas lipídicas, sendo esta interação mediada ou não por quitosana. As técnicas de análise empregadas nesta tese para a caracterização dos compostos foram MET, MEV, Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível, espectroscopia eletrônica de fotoluminescência, TGA, DTA e difração de raio-x (DRX).

Palavras-chave: Porfirina. Nanoencapsulação. *Spray Drying*. Sistema carregador.

ABSTRACT

Luz, P. P. **Nanoencapsulated porphyrins obtained by ultrasonic spray drying.** 2008. 178p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Initially in this work, we developed a low cost spray dryer to be used in the encapsulation experiments by spray drying process. Dextrin was employed as a polymeric matrix in the development experiments for this equipment because it is a biocompatible, biodegradable, hydrophilic and economically viable polymer. The nanoparticulate dextrin integrity obtained by spray drying was verified by Thermal Gravimetric Analysis (TGA) and Differential Thermal Analysis (DTA), and the success of the equipment to produce spherical particles was attested by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). After we projected the final configuration of the spray dryer equipment, the studies about the encapsulation polymeric nanospheres were initiated by establishing an encapsulation method. The polymer used as an encapsulating agent in this step was dextrin and the active materials employed were the 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulphonatophenyl) porphyrin (TPPS₄) and the manganese(III) 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulphonatophenyl) porphyrin (MnTPPS₄), both hydrophilic. In this work, the metalloporphyrin was incorporated in order to use the metallic ion as a spectroscopic probe, thus making it possible to detect the ion in the particles. Once the encapsulation method was established, we began to use chitosan as the polymeric matrix and the 5, 10, 15, 20-tetra(N-methyl-4-piridyl) porphyrin (TMPyP) as the active material. The cytotoxicity and photocytotoxicity of the chitosan nanospheres, free TMPyP and TMPyP loaded

in chitosan nanospheres were verified by studies with J774-A1 neoplastic macrophage lineage cell culture. Besides these studies, the applicability of chitosan as a vehicle for Photodynamic Therapy was also investigated by the interaction between the TMPyP with lipidic monolayers, being this interaction mediated or not by chitosan. The technical analyses employed in this thesis to characterize the compounds were TEM, SEM, UV-Vis Spectroscopy, Photoluminescence Electronic Spectroscopy, TGA, DTA and x-ray Diffraction (XRD).

Keywords: Porphyrin. Nanoencapsulation. Spray Drying. Delivery System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Internações por neoplasias malignas no SUS (2000-2005). ⁴	2
Figura 2: Gastos federais em assistência oncológica. ⁴	3
Figura 3: Friedrich Meyer-Betz a) antes da aplicação de Hp IX e b) três dias depois da aplicação de Hp IX, com um dia de exposição à luz solar. ¹⁸	7
Figura 4: Estrutura do fotossensibilizador HpD aprovado para aplicação clínica.	8
Figura 5: Ilustração de um tratamento por TFD. ²⁷	9
Figura 6: Diagrama de Jablonski e mecanismos de ação em TFD. As setas vermelhas são referentes a processos não-radiativos e as setas azuis a processos radiativos.....	10
Figura 7: Estruturas moleculares dos fotossensibilizadores aprovados para aplicação clínica: a) Visudyne [®] , b) Foscan [®] , c) Levulan [®] e d) Metvix [®]	12
Figura 8: Estrutura molecular base das porfirinas.	13
Figura 9: Estrutura molecular da TMPyP.	14
Figura 10: Representação do bombeamento de prótons que ocorre na mitocôndria. ⁵⁷	18
Figura 11: Número de publicações envolvendo os temas <i>Photodynamic Therapy and Drug Delivery</i> por ano. Fonte: <i>Web of science</i> – outubro de 2008....	19
Figura 12: Representação esquemática de a) um sistema reservatório (nanocápsula) e b) um sistema matriz (nanoesfera). ⁷¹	23
Figura 13: Estrutura molecular da dextrina.	25
Figura 14: Estruturas moleculares da a) quitina e b) quitosana.	26
Figura 15: Mecanismo simplificado da reação de desacetilação alcalina da quitina.....	26
Figura 16: Produtos de degradação da quitosana.....	27
Figura 17: Representação ilustrativa do processo <i>spray drying</i>	29
Figura 18: Representação de um <i>spray dryer</i> comercial e suas respectivas partes.	33
Figura 19: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanoesferas de dextrina.	34
Figura 20: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanoesferas.....	36

Figura 21: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanopartículas, com a fita de aquecimento na saída do forno.....	37
Figura 22: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanoesferas.....	38
Figura 23: Esquema do <i>spray dryer</i> desenvolvido para a realização das encapsulações. ¹⁰⁷	40
Figura 24: Reação de inserção de Mn(III) na TPPS ₄	43
Figura 25: Metabolização do MTT para a formação do sal formazan pelas células viáveis.	53
Figura 26: Representação ilustrativa do experimento de citotoxicidade.....	55
Figura 27: Representação ilustrativa do experimento de fotocitotoxicidade.....	56
Figura 28: Estrutura molecular do DPPG, fosfolipídio utilizado como modelo de membrana biológica. ¹¹⁴	57
Figura 29: Tensiômetro de gota pendente.	59
Figura 30: Representação ilustrativa da gota formada.....	61
Figura 31: Adsorção de moléculas anfifílicas formando uma monocamada orientada na interface ar-água.	62
Figura 32: Esquema da cuba de Langmuir e acessórios utilizados na fabricação de monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir- Blodgett.	64
Figura 33: Representação da transferência da monocamada para o substrato....	65
Figura 34: Método de Langmuir-Blodgett para a fabricação de filmes: (a) filme tipo X, (b) filme tipo Y e (c) filme tipo Z.	66
Figura 35: Esquema de um cristal de quartzo recoberto com ouro.....	66
Figura 36: Estrutura molecular do DMPA.....	67
Figura 37: Filme LB de DMPA.....	67
Figura 38: Filme LB de DMPA + DPPG.....	68
Figura 39: Filme LB de DMPA + DPPG + quitosana.	68
Figura 40: Formação dos filmes LB de DMPA + DPPG e DMPA + DPPG + quitosana e incorporação de TMPyP os filmes.	69
Figura 41: Imagem de MEV das nanoesferas produzidas no 12 ^o experimento.....	74
Figura 42: Imagens de MEV de a) dextrina nanoesférica obtida após o processo de spray drying (13 ^o Experimento) e b) dextrina de partida.....	76
Figura 43: Distribuição dos diâmetros das partículas esféricas de dextrina.....	77

Figura 44: a) Imagem de MET das nanoesferas de dextrina e b) Espectro de EDS de uma nanoesfera de dextrina.	78
Figura 45: Análises térmicas a) dextrina de partida b) dextrina nanoesférica.	79
Figura 46: Imagens de MEV para avaliar o efeito da concentração no tamanho de partícula de dextrina.	82
Figura 47: Distribuição do tamanho de partícula em diferentes concentrações da solução de dextrina.	84
Figura 48: Variação do diâmetro médio das esferas de dextrina em função da concentração da solução polimérica.	85
Figura 49: Espectros UV-Vis em solução aquosa de a) TPPS ₄ de partida ($1,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e b) MnTPPS ₄ obtida.	88
Figura 50: a) Modelo dos quatro orbitais de Gouterman e b) Diagrama de níveis de energia de orbitais π de uma metaloporfirina.	89
Figura 51: Imagem de MEV das esferas de dextrina contendo MnTPPS ₄ veiculada.	91
Figura 52: a) Imagem de MET das esferas de dextrina contendo MnTPPS ₄ veiculada e b) EDS de esferas de dextrina contendo ou não a metaloporfirina.	92
Figura 53: a) Imagem de MEV das esferas de dextrina contendo TPPS ₄ veiculada e b) Distribuição do tamanho das nanoesferas obtidas.	94
Figura 54: Imagens de MET das esferas de dextrina contendo TPPS ₄ veiculada.	95
Figura 55: a) Espectro de excitação da TPPS ₄ nanoencapsulada (0,7% m/m) ($\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$). Espectros de emissão da TPPS ₄ : b) nas misturas físicas e c) nanoencapsulada (0,7% m/m). d) Comparação entre as intensidades de emissão em 650 nm da TPPS ₄ nanoencapsulada e presente nas misturas físicas ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$).	99
Figura 56: Espectro de emissão da TPPS ₄ em solução aquosa ($1,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).	100
Figura 57: Imagens de MEV da TPPS ₄ a) encapsulada em nanoesferas de dextrina (0,7% m/m) e b) presente nas misturas físicas (0,8% m/m).	101

Figura 58: Espectros de absorção da TPPS ₄ a) encapsulada em nanoesferas de dextrina (0,7% m/m) e b) presente nas misturas físicas (0,8% m/m). KM = Kubelka Munk.....	102
Figura 59: Diagrama de níveis de energia dos orbitais π de uma porfirina.	103
Figura 60: Espectro de ¹ H RMN de uma solução 1% de quitosana em D ₂ O/HCl (100:1 v/v), adquirido a 80°C.....	104
Figura 61: a) e b) imagens de MEV da quitosana comercial e nanoesférica; c) distribuição do diâmetro das nanoesferas.....	106
Figura 62: Espectro de infravermelho da quitosana comercial.....	108
Figura 63: Espectro de infravermelho das nanoesferas de quitosana produzidas.....	108
Figura 64: a) Imagem de MEV das esferas de quitosana contendo TMPyP veiculada e b) distribuição do diâmetro destas partículas.	110
Figura 65: Difratogramas: (a) quitosana comercial, (b) nanoesferas de quitosana produzidas por spray drying, (c) TMPyP veiculada em nanoesferas de quitosana e (d) TMPyP comercial.	111
Figura 66: Espectro de absorção UV-Vis da TMPyP a) livre em solução aquosa e b) encapsulada em nanoesferas de quitosana. KM = Kubelka Munk.	113
Figura 67: Perfil de liberação, em tampão fosfato pH 7,4, da TMPyP incorporada nas nanoesferas de quitosana.	116
Figura 68: Modelo cinético de Higuchi para a liberação da TMPyP, em tampão fosfato pH 7,4, veiculada em nanoesferas de quitosana.....	117
Figura 69: Viabilidade celular da linhagem J774-A11 após 3 horas de incubação com as amostras estudadas: CT = controle interno, PV = nanoesferas de quitosana vazias, PL1 = TMPyP 1,0.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , PL3 = TMPyP 3,0.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , PL5 = TMPyP 5,0.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , PP1 = TMPyP/quitosana 1,0.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , PP3 = TMPyP/quitosana 3,0.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , PP5 = TMPyP/quitosana 5,0.10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-Way ANOVA seguido pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias \pm SEM (Standard error of the mean) (n=3). Valores de P: * p>0,05 com relação ao controle.	119

Figura 70: Viabilidade celular da linhagem J774-A1 após 3 horas de incubação com as amostras estudadas: CT = controle interno irradiado com 10 J, PL5J= TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 5 J cm⁻², PP5J = TMPyP/quitosana $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 5 J cm⁻², PL10J = TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 10 J cm⁻², PP10J = TMPyP/quitosana $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 10 J cm⁻². Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-Way ANOVA seguido pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias \pm SEM (n=3). Valores de P: * p>0.05, ** p<0.05 e *** p<0.01 com relação ao controle..... 121

Figura 71: Membrana celular.¹¹⁴ 122

Figura 72: Cinética de adsorção da TMPyP na monocamada de DPPG mantida inicialmente a 30 mN m⁻¹. 123

Figura 73: Micrografia obtida pelo método da gota pendente. 124

Figura 74: Espectros de emissão da TMPyP incorporada no filme LB de DMPA+ DPPG ($\lambda_{exc} = 515$ nm). 125

Figura 75: Espectro de emissão da TMPyP em solução aquosa ($2,4 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ $\lambda_{exc} = 515$ nm). 126

Figura 76: Cinética de adsorção da TMPyP ao filme de DPPG contendo quitosana. 127

Figura 77: Espectros de emissão dos filmes LB de DMPA + DPPG + quitosana ($\lambda_{exc} = 515$ nm). 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores obtidos na cinética de deposição da TMPyP aos filmes LB.....	70
Tabela 2: Valores de tamanho de partícula determinado por espalhamento de luz laser.....	86
Tabela 3: Valores obtidos de % em massa de MnTPPS ₄ e Eficiência de Encapsulação da MnTPPS ₄ em 10,0 mg de nanoesferas de dextrina. Média de 3 determinações.....	93
Tabela 4: Valores obtidos de % em massa de TPPS ₄ e Eficiência de Encapsulação da TPPS ₄ em 10,0 mg de nanoesferas de dextrina. Média de 3 determinações.....	96
Tabela 5: Bandas presentes nos espectros de infravermelho da quitosana comercial e nanoesférica.....	109
Tabela 6: Valores obtidos de % em massa de TMPyP e Eficiência de Encapsulação da TMPyP em 8,0 mg de nanoesferas de quitosana. Média de 3 determinações.....	114
Tabela 7: Viabilidade celular após a incubação por 3 horas com as amostras estudadas.....	119
Tabela 8: Viabilidade celular após a incubação por 3 horas com as amostras estudadas e aplicação de luz nas doses 5 e 10 J cm ⁻²	121

LISTA DE ABREVIATURAS

- **INCA:** Instituto Nacional de Câncer
- **ICCC:** Congresso Internacional de Controle de Câncer
- **SUS:** Sistema Único de Saúde
- **DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- **TFD:** Terapia Fotodinâmica
- **FS:** Fotossensibilizador
- **Hp IX:** Hematoporfirina IX
- **HpD:** Derivado de hematoporfirina
- **FDA:** Food and Drug Administration
- **CIS:** Conversão Intersistema
- **¹O₂:** Oxigênio singlete
- **EMEA:** European Medical Agency
- **CPHA:** Canadian Public Healthy Agency
- **O₂:** Oxigênio molecular
- **TPPS₄:** 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina
- **TMPyP:** 5, 10, 15, 20-tetra(N-metil-4-piridil) porfirina
- **MnTPPS₄:** Manganês(III) 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina
- **BSA:** Soro albumina bovina
- **LDL:** Lipoproteína de baixa densidade
- **HDL:** Lipoproteína de alta densidade
- **RNA:** Ácido ribonucléico
- **p-THFP:** Meso-tetra(hidroxifenil) porfirina
- **PLGA:** Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
- **PLA:** Poli(ácido lático)

- **PLG:** Poli(ácido glicólico)
- **Te:** Temperatura de entrada
- **Ts:** Temperatura de saída
- **MEV:** Microscopia eletrônica de varredura
- **MET:** Microscopia eletrônica de transmissão
- **TGA:** Análise termogravimétrica
- **DTA:** Análise térmica diferencial
- **DRX:** Difração de raio-X
- **EDS:** Espectroscopia de energia dispersiva
- **Espectroscopia UV-Vis:** Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível
- **CCD:** Cromatografia de camada delgada
- **Espectroscopia de fotoluminescência:** Espectroscopia eletrônica de fotoluminescência
- **Absorção/reflectância difusa no UV-Vis:** Absorção/reflectância difusa no ultravioleta-visível
- **GA:** Grau de acetilação
- **Ressonância magnética nuclear de próton:** ^1H RMN.
- **Espectroscopia no infravermelho:** Espectroscopia vibracional na região do infravermelho
- **ATCC:** American Type Culture Collection
- **DMEM:** Dupleco Eagle's Minimum Essential Medium
- **MTT:** 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil tetrazolium
- **LB:** Langmuir-Blodgett
- **DPPG:** Dipalmitoilfosfatidilglicerol

- **ADSA:** Axisymmetric drop shape analysis
- **DMPA:** ácido dimiristoilfosfatídico
- **QCM:** Microbalança a Cristal de Quartzo
- **HOMO:** Orbital molecular ocupado de maior energia
- **LUMO:** Orbital molecular desocupado de menor energia
- **CT:** Controle interno
- **PV:** nanoesferas de quitosana vazias
- **PL1:** TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
- **PL3:** TMPyP $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
- **PL5:** TMPyP $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
- **PP1:** TMPyP/quitosana $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
- **PP3:** TMPyP/quitosana $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
- **PP5:** TMPyP/quitosana $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.
- **SEM:** Standard error of the mean
- **PL5J:** TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ irradiada com 5 J cm^{-2}
- **PP5J:** TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ irradiada com 5 J cm^{-2}
- **PL10J:** TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ irradiada com 10 J cm^{-2}
- **PP10J:** TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ irradiada com 10 J cm^{-2}

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Câncer: considerações gerais	1
1.2.	Histórico da Terapia Fotodinâmica.....	5
1.3.	Princípios da TFD – Mecanismos fotoquímicos e fotofísicos	9
1.4.	Fotossensibilizadores – Porfirinas	10
1.5.	Localização intracelular e mecanismos de destruição das células neoplásicas	15
1.6.	Veículo carregador em Terapia Fotodinâmica.....	18
1.6.1.	Polissacarídeos Naturais.....	24
1.7.	Técnicas de encapsulação - <i>Spray Drying</i>	28
2.	OBJETIVOS.....	31
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1.	Desenvolvimento de um <i>spray dryer</i>	32
3.2.	Metodologia utilizada para a determinação do diâmetro médio das partículas produzidas	41
3.3.	Estabelecimento de uma metodologia de encapsulação por <i>spray drying</i>	42
3.3.1.	Síntese e caracterização da MnTPPS ₄	42
3.3.2.	Encapsulação da MnTPPS ₄	43
3.3.3.	Encapsulação da TPPS ₄	44
3.3.4.	Porcentagem de TPPS ₄ e de MnTPPS ₄ associada às nanoesferas de dextrina e eficiência de encapsulação.....	44
3.4.	Estudo espectroscópico da TPPS ₄ encapsulada em nanoesferas de dextrina...	46
3.5.	Determinação do grau de acetilação da quitosana	47
3.6.	Produção de nanoesferas de quitosana por <i>spray drying</i>	48
3.7.	Encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana por <i>spray drying</i>	48

3.7.1.	Porcentagem de TMPyP associada às nanoesferas de quitosana e eficiência de encapsulação	49
3.8.	Avaliação do perfil de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana.....	50
3.9.	Estudos de cito e fototoxicidade das nanoesferas de quitosana, TMPyP livre e TMPyP encapsulada em nanoesferas de quitosana	51
3.9.1.	Materiais.....	51
3.9.2.	Métodos envolvendo células neoplásicas	52
a)	Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas.....	52
b)	Determinação da atividade celular (MTT).....	53
c)	Estudos de citotoxicidade.....	54
d)	Estudos de fotocitotoxicidade.....	55
3.10.	Estudo da interação entre a TMPyP e monocamadas lipídicas mediada por quitosana como agente bioadesivo.....	57
3.10.1.	Método da gota pendente.....	58
a)	Tensão superficial	58
b)	Elasticidade dilatacional superficial.....	61
3.10.2.	Monocamadas de Langmuir e Filmes de Langmuir-Blodgett	62
a)	Adsorção, orientação em interface e monocamadas de Langmuir.....	62
b)	Filmes de Langmuir-Blodgett.....	64
3.11.	Caracterização das amostras.....	70
3.11.1.	Microscopia eletrônica de varredura	70
3.11.2.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	71
3.11.3.	Análises térmicas	71
3.11.4.	Difração de raio-x.....	72
a)	Amostras de dextrina.....	72
b)	Amostras de quitosana, TMPyP e de TMPyP encapsulada em quitosana.....	72

3.11.5.	Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível.....	72
3.11.6.	Espectroscopia eletrônica de fotoluminescência.....	73
3.11.7.	Ressonância magnética nuclear de próton	73
3.11.8.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	73
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1.	Desenvolvimento de um <i>spray dryer</i>	74
4.1.1.	Microscopia eletrônica de varredura: 12º Experimento	74
4.1.2.	Microscopia eletrônica de varredura: 13º Experimento	76
4.1.3.	Microscopia eletrônica de transmissão e Espectroscopia de energia dispersiva	78
4.1.4.	Análises térmicas	79
4.1.5.	Difração de raio-x.....	80
4.2.	Metodologia utilizada para a determinação do diâmetro médio das partículas produzidas	80
4.2.1.	Microscopia eletrônica de varredura	82
4.2.2.	Espalhamento de luz laser	85
4.3.	Estabelecimento de uma metodologia de encapsulação por <i>spray drying</i>	87
4.3.1.	Síntese e caracterização da MnTPPS ₄	87
4.3.2.	Encapsulação da MnTPPS ₄	90
a)	Microscopia eletrônica de varredura	91
b)	Microscopia eletrônica de transmissão e Espectroscopia de energia dispersiva	92
c)	Porcentagem de MnTPPS ₄ associada às nanoesferas de dextrina e eficiência de encapsulação	93
4.3.3.	Encapsulação da TPPS ₄	94
a)	Microscopia eletrônica de varredura	94
b)	Microscopia eletrônica de transmissão.....	95

c)	Porcentagem de TPPS ₄ associada às nanoesferas de dextrina e eficiência de encapsulação	96
4.3.4.	Considerações finais sobre as encapsulações realizadas em dextrina	97
4.4.	Estudo espectroscópico da TPPS ₄ encapsulada em nanoesferas de dextrina.....	97
4.4.1.	Espectroscopia eletrônica de fotoluminescência.....	98
4.4.2.	Microscopia eletrônica de varredura	100
4.4.3	Absorção/reflectância difusa no ultravioleta-visível	101
4.5.	Determinação do grau de acetilação da quitosana	103
4.6.	Produção de nanoesferas de quitosana por <i>spray drying</i>	105
4.6.1.	Microscopia eletrônica de varredura	106
4.6.2.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	108
4.7.	Encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana por <i>spray drying</i>	109
4.7.1.	Microscopia eletrônica de varredura	110
4.7.2.	Difração de raio-x	111
4.7.3.	Absorção/reflectância difusa no ultravioleta-visível	112
4.7.4.	Porcentagem de TMPyP associada às nanoesferas de quitosana e eficiência de encapsulação	114
4.8.	Avaliação do perfil de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana.....	115
4.9.	Estudos de cito e fototoxicidade das nanoesferas de quitosana, TMPyP livre e TMPyP encapsulada em nanoesferas de quitosana	118
4.9.1.	Estudos de citotoxicidade.....	118
4.9.2.	Estudos de fotocitotoxicidade.....	120
4.10.	Estudo da interação entre a TMPyP e monocamadas lipídicas mediada por quitosana como agente bioadesivo.....	122
4.10.1.	Método da gota pendente.....	123

4.10.2.	Filmes Langmuir-Blodgett.....	124
a)	Filme LB composto por DMPA + DPPG	125
b)	Filme LB composto por DMPA + DPPG + quitosana	127
5.	CONCLUSÕES	129
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
	ANEXO	148

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: considerações gerais

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.¹

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele, pois esta é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases).¹

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas.²

Em um anúncio feito pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), durante o 2º Congresso Internacional de Controle de Câncer (ICCC 2007/INCA), realizado de 25 a 28 de novembro, marcando o Dia Nacional de Combate ao Câncer (27 de novembro), a *Estimativa 2008 de Incidência do Câncer no Brasil* revela que aproximadamente 470 mil novos casos da doença deverão ocorrer no país em 2008 e 2009. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer com maior número de novos casos no sexo masculino serão os de próstata e pulmão, enquanto em mulheres a incidência será maior nos cânceres de mama e colo de útero.³ Com relação aos dados mundiais, os registros mostram que 10 milhões de casos foram diagnosticados em 2002 com 6 milhões de mortes ocasionadas por câncer. Previsões estimam que em 2020 cerca de 15 milhões de novos casos sejam diagnosticados no mundo e 12 milhões de pessoas venham a falecer.

O Sistema Único de Saúde (SUS) registrou 423 mil internações por neoplasias malignas em 2005 (Figura 1), além de 1,6 milhão de consultas ambulatoriais em oncologia. Mensalmente são tratados cerca de 128 mil pacientes em quimioterapia e 98 mil em radioterapia ambulatorial.

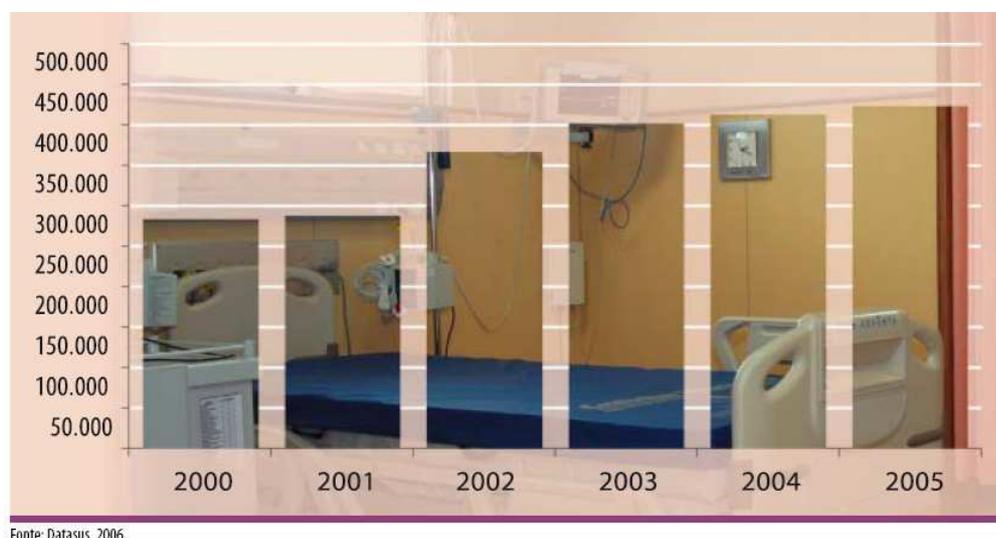


Figura 1: Internações por neoplasias malignas no SUS (2000-2005).⁴

Nos últimos 5 anos ocorreu um aumento expressivo no número de pacientes oncológicos atendidos pelo SUS, o que pode estar refletindo uma melhora na capacidade do sistema em aumentar o acesso aos recursos de tratamento especializado. Este fato fez o governo federal aumentar gastos com a assistência oncológica de R\$ 570,8 milhões em 2000 para R\$ 1,1 bilhão em 2005 (Figura 2).



Fonte: Datasus, 2006.

Figura 2: Gastos federais em assistência oncológica.⁴

No início da história, o tratamento de câncer era feito por meio cirúrgico. Com o desenvolvimento das técnicas do combate à doença, o tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar essas modalidades.⁵ Além disso, o surgimento de novas terapias como a hormonioterapia⁶ e a imunoterapia⁷ tem contribuído para os avanços da oncologia.

A cirurgia normalmente é utilizada na remoção física de tumores, localizados na pele ou internamente. Por segurança, geralmente é retirado uma região maior do que a região tumoral. Assim, a intervenção cirúrgica pode resultar em amputações e desfiguração do paciente, afetando a sua auto-estima e convívio social.

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em

um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada.

Existem vários tipos de radiação, porém as mais utilizadas são as eletromagnéticas (raios-x ou raios gama) e os elétrons (estes disponíveis apenas em aceleradores lineares de alta energia).

Embora a radioterapia exerça menos efeito sobre as células sadias do corpo que sobre as células cancerígenas, as células normais também são, com freqüência, afetadas pelo tratamento. Por essa razão, a radioterapia pode causar efeitos colaterais. Uma vez que a radioterapia é um tratamento local administrado a uma parte específica do corpo, a maioria dos efeitos colaterais depende da parte do corpo que sendo tratada. Os efeitos colaterais mais comuns são náusea, diarréia, queda de cabelo, queimaduras na pele, cansaço e diminuição do número de glóbulos brancos.⁸

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral. Os medicamentos para quimioterapia são, também, conhecidos como citotóxicos.⁹

Algumas medicações interagem com os receptores na superfície das células, enquanto outras rompem o funcionamento normal do ácido desoxiribonucleico (DNA), para sustar a multiplicação. Com freqüência, são administradas combinações de medicações quimioterápicas que atacam estágios diferentes do processo de multiplicação celular, o que aumenta as chances de destruição de um número maior de células doentes.¹⁰

Geralmente, a quimioterapia é um tratamento sistêmico, no qual todo o corpo é afetado de uma vez só, e as medicações não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. As estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pêlos e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas pela ação dos quimioterápicos. No entanto, como as células normais apresentam um tempo de recuperação previsível, ao contrário das células neoplásicas, é possível que a quimioterapia seja aplicada repetidamente, desde que observado o intervalo de tempo necessário para a recuperação da medula óssea e da mucosa do tubo digestivo. Por este motivo, a quimioterapia é aplicada em ciclos periódicos.¹⁰

Muitos dos efeitos colaterais, como anemia (diminuição dos glóbulos vermelhos do sangue), leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos do sangue), alopecia (queda de cabelo), alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) e adinamia (prostração física), resultam dos danos causados pela quimioterapia sobre as células normais do corpo. Recentemente, foram introduzidas medicações de suporte que podem amenizar os efeitos colaterais.¹⁰

Comparada aos tratamentos convencionais, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a Terapia Fotodinâmica (TFD) oferece a vantagem de ser um método seletivo e efetivo para o tratamento de tecidos neoplásicos sem ocasionar danos aos tecidos saudáveis ao redor.¹¹

1.2. Histórico da Terapia Fotodinâmica

As pesquisas indicam que o início da utilização de luz visível e de fotossensibilizador (FS) ocorreu há, aproximadamente, 4000 anos no Egito, na Índia e na China cujas civilizações ingeriam extratos de plantas (contendo psolarenos), seguida de exposição à luz do sol, para tratar pacientes com vitiligo ou psoríasis.^{12,13}

Entretanto, por ter sido a primeira publicação envolvendo esta técnica, a origem da TFD foi atribuída à Raab, estudante de medicina em Munique (Alemanha) e aluno de von Tappeiner, que em 1900 relatou o efeito letal da luz no protozoário paramécio tratado com o corante acridina. Este efeito não foi observado na ausência de irradiação.¹⁴

A primeira aplicação clínica da TFD foi descrita por von Tappeiner e Jesionek em 1903, que aplicaram a eosina topicamente ao carcinoma basocelular em humanos antes da irradiação.¹⁵ Posteriormente, von Tappeiner e Jodlbauer definiram TFD como a interação dinâmica entre a luz, o agente fotossensibilizador e oxigênio, resultando na destruição do tecido.¹⁵

Os estudos de fotocitotoxicidade da hematoporfirina IX (Hp IX) foram iniciados em 1908 por Hausmann, mediante administração da droga em camundongos e exposição à luz solar. Os resultados obtidos foram associados à destruição da vascularidade tumoral.^{16,17} Por outro lado, Friedrich Meyer-Betz estudou o efeito da atividade fotodinâmica de Hp IX em humanos. Para isso, injetou em si próprio 200 mg desta porfirina e manteve-se dois dias sob proteção da luz, sem apresentar nenhum efeito dermatológico. Após este período, foi exposto ao sol e sofreu uma forte reação de eritema solar, indicando que a Hp IX possui efeitos fototóxicos (Figura 3). Ele observou que, protegendo o lado esquerdo da face, os efeitos ficaram restritos ao lado direito. Além disto, Meyer-Betz apresentou fotossensibilidade prolongada aos efeitos da TFD, que se estenderam por vários meses.¹³

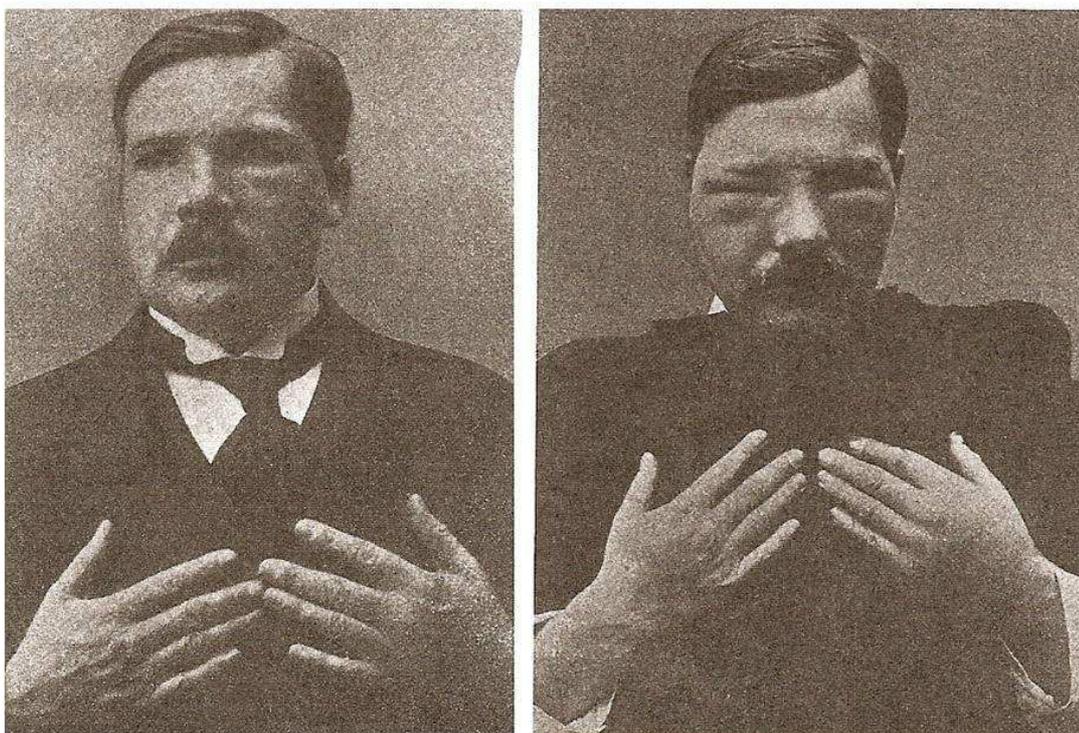


Figura 3: Friedrich Meyer-Betz a) antes da aplicação de Hp IX e b) três dias depois da aplicação de Hp IX, com um dia de exposição à luz solar.¹⁸

Posteriormente, em 1950, Schwartz demonstrou que os efeitos colaterais observados por Meyer-Betz não correspondiam à Hp IX, visto que este composto é facilmente eliminado pelo organismo, mas sim a uma mistura de derivados diméricos e oligoméricos da Hp IX proveniente do método de preparação.¹⁹ Esta mistura foi chamada de derivado de hematoporfirina.

Em 1960, Lipson, aluno de Schwartz, sintetizou um derivado de hematoporfirina (Photofrin[®] I, HpD) que possuía a propriedade de se localizar seletivamente nos tumores, tornando-se assim o primeiro corante a ser utilizado clinicamente em terapia fotodinâmica (Figura 4).¹⁵ Lipson tratou com sucesso uma mulher que possuía câncer de mama utilizando HpD e irradiação seletiva do tumor.

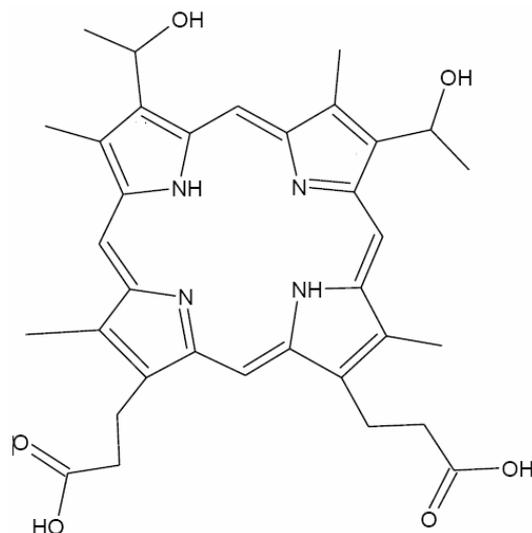


Figura 4: Estrutura do fotossensibilizador HpD aprovado para aplicação clínica.

Estudos pré-clínicos, usando o HpD, foram realizados por Dougherty e colaboradores em 25 pacientes e mostraram uma necrose parcial ou completa em 111 dos 113 tumores tratados. A purificação da HpD realizada por Dougherty levou a produção do Photofrin[®] II, que é o fotossensibilizador mais utilizado e a primeira droga aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de câncer de bexiga, pulmão e esôfago.¹¹ Muitos trabalhos foram e estão sendo realizados, contribuindo para o desenvolvimento e aprovação de novos fotossensibilizadores pelos órgãos internacionais de vigilância.

No Brasil a TFD está se difundindo e vem sendo aplicada em alguns centros especializados, como o Hospital do Câncer de São Paulo, o Hospital do Câncer de Jaú, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Hospital Sírio Libanês e Incor, em São Paulo. Não bastasse uma taxa de 80% de sucesso para os casos de câncer de pele (não melanoma), pesquisas vêm sendo feitas para aplicar a técnica também em outras doenças.

1.3. Princípios da TFD - Mecanismos fotoquímicos e fotofísicos

A Terapia Fotodinâmica tem se tornado uma modalidade aceita para o tratamento de câncer e várias doenças não oncológicas (psoríase, artrite reumatóide sistêmica, degeneração macular da retina, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arterioesclerose).^{11,20,21,22,23,24}

Na oncologia, a TFD consiste na administração sistêmica ou local de um fotossensibilizador, que se acumula preferencialmente em tecidos malignos, em combinação com oxigênio e luz (Figura 5).^{11,20,21,25,26}

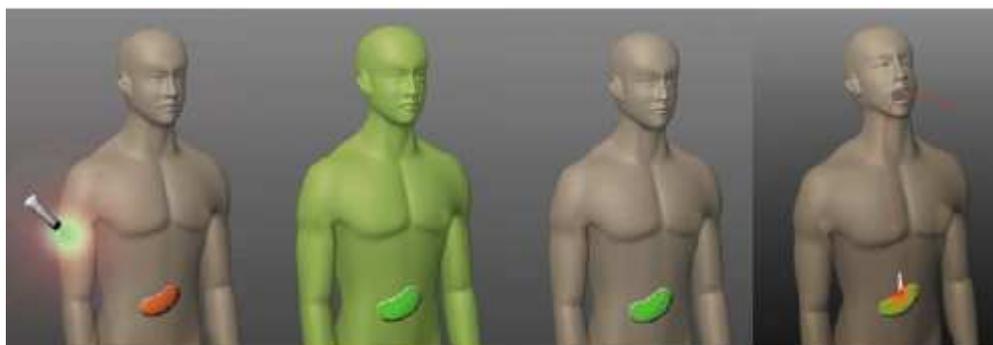


Figura 5: Ilustração de um tratamento por TFD.²⁷

A irradiação do tecido doente é realizada com luz em um comprimento de onda e dose energética apropriados e com um tempo adequado após a administração do FS, correspondendo à máxima retenção do FS no tecido alvo. A ativação do fotossensibilizador através da absorção desta luz leva o fármaco do seu estado energético fundamental (^1FS) para um estado singlete excitado ($^1\text{FS}^*$).²⁸ A partir deste estado, o fármaco pode decair diretamente para o estado fundamental, no fenômeno chamado fluorescência, que é uma propriedade que pode ser utilizada clinicamente para a fotodeteção. Entretanto, para obter um efeito fotodinâmico terapêutico, o fotossensibilizador deve sofrer conversão eletrônica de spin para um

estado triplete excitado, que é o estado fotoativo, ($^3\text{FS}^*$), num processo chamado Conversão Intersistema (CIS). Na presença de oxigênio, o $^3\text{FS}^*$ pode reagir diretamente com um substrato por transferência de próton ou de elétron, para formar radicais ou íons radicais que podem interagir com o oxigênio para produzir produtos oxigenados (mecanismo tipo I). Alternativamente, a energia do $^3\text{FS}^*$ pode ser diretamente transferida para o oxigênio para formar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo II), sendo este considerado a principal espécie ativa em TFD (Figura 6).^{15,29}

As espécies reativas de oxigênio produzidas são citotóxicas e levam à destruição seletiva dos tecidos neoplásicos.^{30,31,32} Estas espécies são responsáveis pelo dano irreversível a várias membranas celulares, incluindo a plasmática, a mitocondrial, a lisossomal e a nuclear.¹¹

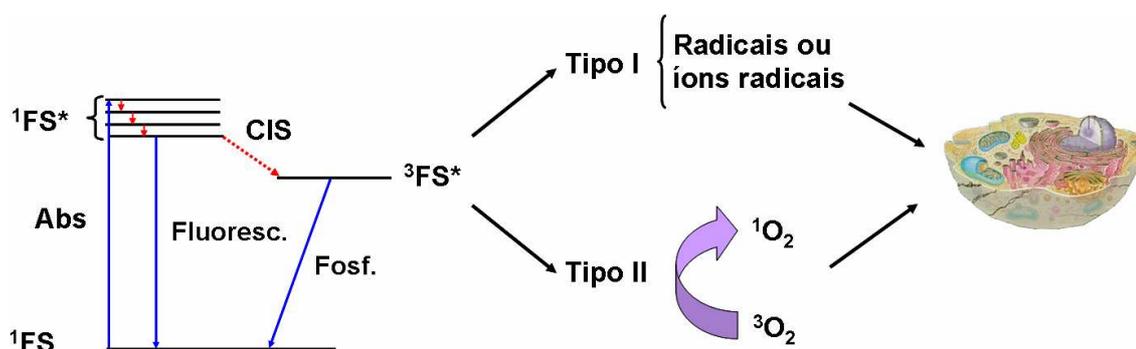


Figura 6: Diagrama de Jablonski e mecanismos de ação em TFD. As setas vermelhas são referentes a processos não-radiativos e as setas azuis a processos radiativos.

1.4. Fotossensibilizadores - Porfirinas

Um dos caminhos essenciais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. O objetivo é encontrar compostos que sejam tumor-seletivos, melhorem o acúmulo no tecido maligno, penetrem na célula tumoral, apresentem desejáveis propriedades fotoquímicas e fotofísicas e sejam passíveis de produção em larga escala, aumentando a acessibilidade da TFD

para população.³³ A síntese e caracterização de novos FS têm contribuído para a concretização deste objetivo e para o entendimento da relação existente entre estrutura molecular e atividade, viabilizando o avanço da TFD.

Conforme já foi mencionado no item 1.2, o primeiro fotossensibilizador aprovado pelo FDA para ser utilizado clinicamente foi o Photofrin[®], que é um derivado de hematoporfirina e que apresenta outros variantes comerciais (Photosan[®], Photogem[®], Photocarcinorin[®] e Haematodrex[®]).^{34,35} Em virtude dos bons resultados em estudos clínicos, o Photofrin[®] já foi aprovado pelos órgãos de saúde de mais de 40 países para tratamento de diversos tipos de câncer.³⁴ Atualmente, mais três compostos aprovados pelo FDA estão sendo empregados na TFD: o Visudyne[®] (verteporfina ou monoácido derivado de benzoporfirina) para o tratamento da degeneração macular, o Levulan[®] (ácido aminolevulínico) no tratamento da queratose actínica e o Metvix[®] (aminolevulinato de metila) no tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular (Figura 7).^{34,36,37} É importante ressaltar que o Visudyne[®] foi recentemente aprovado pela EMEA (European Medical Agency) e a CPHA (Canadian Public Healthy Agency) para o tratamento da degeneração macular.³⁴ O Foscan[®] (m-tetrahidroxifenilclorina) (Figura 7) foi aprovado como fotossensibilizador pela EMEA para uso no tratamento de carcinomas celulares da cabeça e do pescoço.³⁸ Além disso, outros compostos estão sendo estudados em testes clínicos de fase I, II e III, para aplicações em diversos tipos de câncer.

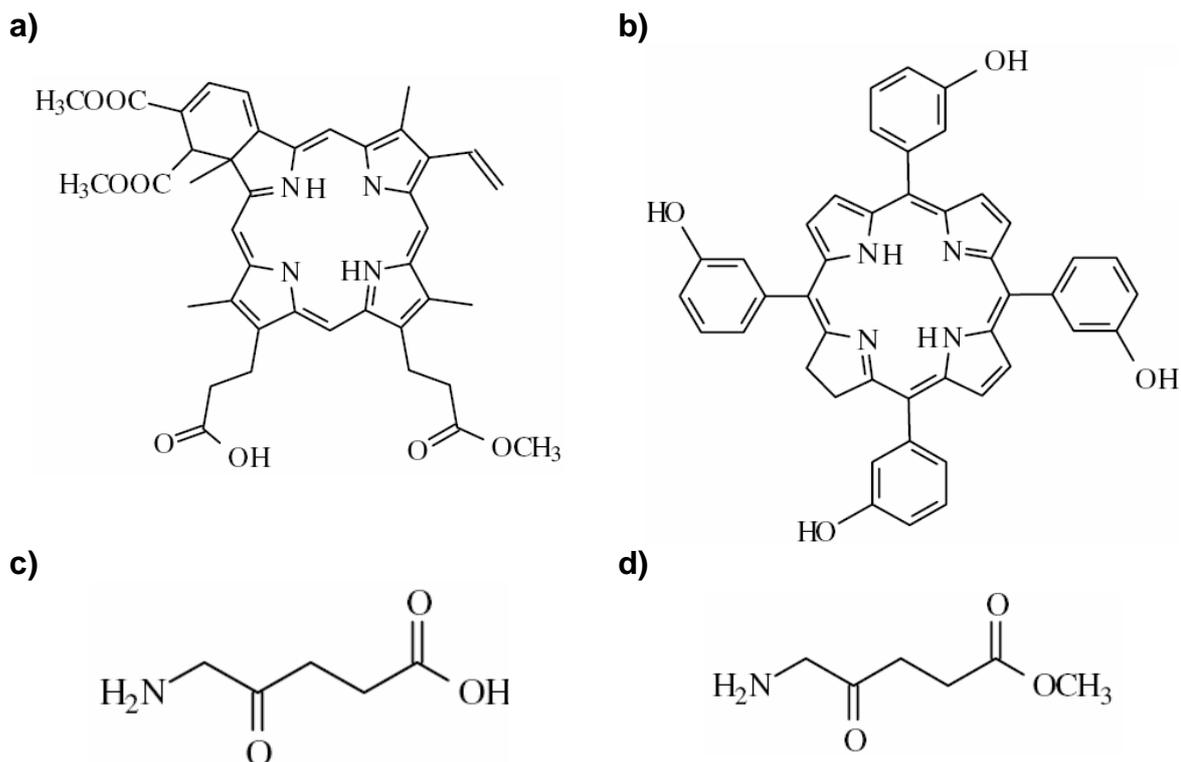


Figura 7: Estruturas moleculares dos fotossensibilizadores aprovados para aplicação clínica: a) Visudyne[®], b) Foscan[®], c) Levulan[®] e d) Metvix[®].

Em geral, um fotossensibilizador precisa compreender determinados pré-requisitos para que possa ser utilizado com sucesso na terapia fotodinâmica, como por exemplo:

- 1) Absorver na janela fototerapêutica (600-800nm),
- 2) Altos rendimentos quânticos de formação de estado triplete e de oxigênio singlete,
- 3) Solubilidade em meio fisiológico, facilitando a aplicação do FS,
- 4) Baixa citotoxicidade no escuro,
- 5) Rápida eliminação pelo organismo, evitando que o indivíduo apresente fotossensibilidade prolongada,
- 6) Passível de produção em escala industrial,
- 7) Permeabilidade em tecido e seletividade tumoral.

Entre os compostos usados em TFD podemos destacar as porfirinas e seus derivados, clorinas e bacterioclorinas, as ftalocianinas e naftalocianinas.³⁹ Nesta

tese, as porfirinas foram escolhidas como fotossensibilizadores a serem encapsulados em matrizes poliméricas.

As porfirinas (Figura 8) e seus derivados, que podem conter substituintes periféricos ou cátions metálicos incorporados, são moléculas constituídas por quatro anéis pirrólicos interligados por quatro pontes de um átomo de carbono cada (pontes meso-metino). São substâncias que possuem uma extensa conjugação de ligações π , exibindo assim uma intensa coloração. Estes compostos têm sido utilizados em muitas pesquisas como potenciais FS para a TFD de câncer, pois apresentam propriedades fotofísicas adequadas para transferir energia às moléculas de oxigênio molecular (O_2) e produzir a espécie citotóxica 1O_2 .^{40,41}

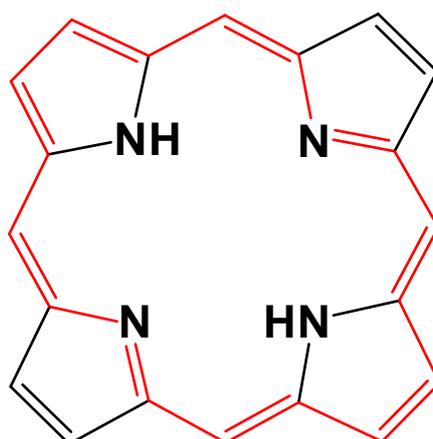


Figura 8: Estrutura molecular base das porfirinas.

Neste trabalho de doutorado, as porfirinas modelos que foram encapsuladas são:

- 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina (TPPS₄ – cuja estrutura molecular será apresentada na Figura 24)
- 5, 10, 15, 20-tetra(N-metil-4-piridil) porfirina (TMPyP - Figura 9).

Além destas porfirinas, uma metaloporfirina, a manganês(III) 5, 10, 15, 20-tetra(4-sulfonatofenil) porfirina (MnTPPS₄ - cuja estrutura molecular será apresentada na Figura 24), foi encapsulada com o único propósito de que o metal

atuasse como sonda e possibilitasse a localização da metaloporfirina no veículo carregador polimérico.

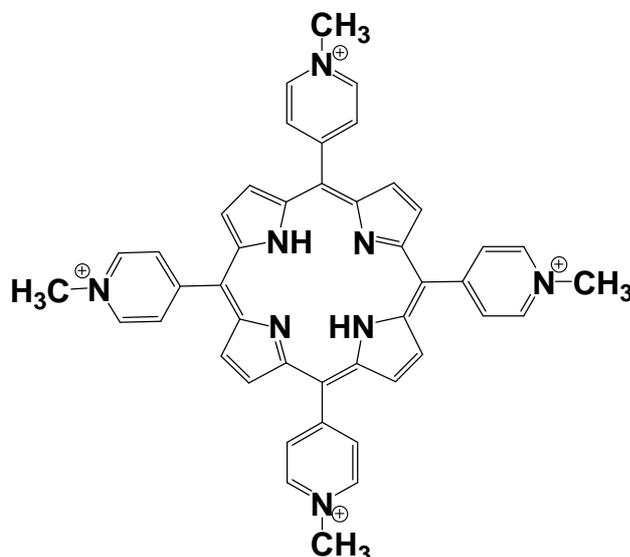


Figura 9: Estrutura molecular da TMPyP.

Sibone e colaboradores mencionam que para maximizar a eficiência da TFD e minimizar os efeitos de toxicidade, uma variedade de fotossensibilizadores exógenos está sendo estudada para alcançar elevados rendimentos quânticos de $^1\text{O}_2$, rápida e eficiente retenção celular e rápida eliminação. Neste sentido, apontam a TMPyP, a TPPS₄ e éteres de pirofeoforbide como sensibilizadores exógenos apropriados para a aplicação em TFD experimental.⁴²

Do ponto de vista econômico e sintético a TPPS₄ é a porfirina solúvel em água mais acessível. Muitas aplicações potenciais têm sido reportadas para a TPPS₄, por exemplo, como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica devido às suas propriedades fotoquímicas, fototoxicidade e considerável afinidade tumoral.^{43,44,45,46} Esta significativa afinidade tumoral foi relatada por Winkelman e colaboradores em seus estudos com tumores de ratos. Nestas pesquisas puderam verificar que a TPPS₄ acumula até quatro vezes mais em tumores do que em outros órgãos.^{47,48} Borissevitch e colaboradores mencionam em seus trabalhos a

importância da TPPS₄ como fotossensibilizador para TFD experimental. Através de propriedades fotofísicas, verificaram que há interação da TPPS₄ com soro albumina bovina (BSA) e que o tempo de vida do estado triplete excitado da TPPS₄ em sua forma monomérica é maior quando esta se encontra ligada à BSA do que livre.^{41,49}

As metaloporfirinas hidrossolúveis são materiais interessantes em muitos campos de aplicação, como, por exemplo, em processos oxidativos.^{43,44} Os derivados metálicos da TPPS₄ têm sido considerados protótipos de agentes de contraste, específicos para tumores, em radiologia e ressonância magnética.^{41,45}

1.5. Localização intracelular e mecanismos de destruição das células neoplásicas

A eficiência de um fotossensibilizador depende da sua interação com componentes do plasma sanguíneo, do acúmulo nos tumores e da sua localização intracelular.

Os fotossensibilizadores administrados sistemicamente tendem a acumular preferencialmente em tumores, deixando o tecido normal intacto. A explicação para este acúmulo preferencial ainda não está totalmente elucidada, porém, fatores relacionados com a arquitetura do tumor e propriedades do fotossensibilizador podem influenciar nesta seletividade. A entrada passiva do FS pode ser resultado da alta taxa de divisão celular das células neoplásicas, deficiente drenagem linfática, vasculatura comprometida e maior interação entre o FS e a célula neoplásica, devido à carga, tamanho e estrutura do FS.⁵⁰

Uma possível explicação para o acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores nos tumores é a ligação entre as substâncias fotossensíveis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), localizadas nas células tumorais e nas

células endoteliais vasculares do tumor.⁵⁰ Como a maioria das células tumorais apresentam maior concentração de receptores deste tipo de lipoproteína em comparação às células normais, há um acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores sobre o tecido tumoral, de maneira que tem sido aceito que a seletividade aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizante.^{36,51} Entretanto, nem todos os tumores apresentam elevada concentração de receptores LDL e, neste caso, o fotossensibilizador pode se ligar a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e albumina, fato que permite a retenção do fotossensibilizador no estroma tumoral sem o intermédio de receptores.⁵² Outros fatores que podem contribuir para a retenção do FS nos tumores, são a alta quantidade de colágeno no estroma tumoral, que tem mostrado ligar porfirinas, e a alta quantidade de lipídios nos tecidos neoplásicos e que apresentam considerável afinidade por corantes lipofílicos.⁵⁰

As membranas biológicas estão entre os principais alvos da TFD.⁵³ Os estudos têm mostrado que os fotossensibilizadores podem ser localizados na membrana plasmática, lisossomos, mitocôndria e citoplasma.^{23,50,54} Kessel e colaboradores demonstraram em seus estudos que os fotossensibilizadores localizados na mitocôndria induzem a morte celular por apoptose. Por outro lado, os fotossensibilizadores localizados no lisossomo e na membrana plasmática provocam a morte celular por necrose.^{55,56}

Necrose e apoptose são dois mecanismos distintos de morte das células eucarióticas. A necrose geralmente ocorre devido a lesões físicas, ocasionadas por agentes físicos, agentes químicos e agentes biológicos. Esses agentes provocam o comprometimento dos níveis celulares de respiração aeróbica, de síntese protéica, de manutenção da integridade das membranas celulares e de manutenção da

capacidade de multiplicação celular (RNA - ácido ribonucléico - e DNA). As membranas das células necróticas perdem a sua integridade, ocorrendo extravasamento de substâncias contidas nas células. Como consequência da necrose ocorre inflamação nos tecidos adjacentes para a eliminação dos tecidos mortos e posterior reparo. Durante este processo inflamatório acumulam-se leucócitos na periferia do tecido lesado, que liberam enzimas úteis na digestão das células necróticas.

A apoptose é uma morte geneticamente programada devido aos danos genéticos subletais que sinalizam a uma série de proteases, como as caspases, para catalisar reações hidrolíticas responsáveis pela clivagem e inativação de proteínas que protegem as células da morte. Ao contrário da necrose, a célula em apoptose murcha e é removida pelo sistema de defesa.

O fato da apoptose não causar processos inflamatórios na região irradiada é vantajoso para os pacientes com câncer, quando comparada a uma massiva necrose e uma subsequente inflamação da região necrosada. Neste sentido, as mitocôndrias têm se mostrado um alvo chave para a TFD, uma vez que a literatura reporta a indução da morte celular por apoptose pelos fotossensibilizadores localizados na mitocôndria.

Outrossim, a literatura relata um acúmulo preferencial de fotossensibilizadores catiônicos no interior das mitocôndrias. A força motriz para isto é o potencial eletrostático que existe na membrana interna da mitocôndria e que é causado pelo bombeamento de prótons para fora da membrana mitocondrial, gerando um acúmulo de cargas negativas no interior desta organela (Figura 10). Além disso, as células tumorais exibem um elevado número de mitocôndrias, o que aumenta a seletividade de corantes catiônicos pelas células neoplásicas.²³ Embora a literatura ainda

mencione a importância de determinado grau de lipofilicidade nos corantes catiônicos para melhorar a seletividade pelas mitocôndrias, decidimos utilizar a TMPyP como fotossensibilizador modelo nos nossos estudos de encapsulação.

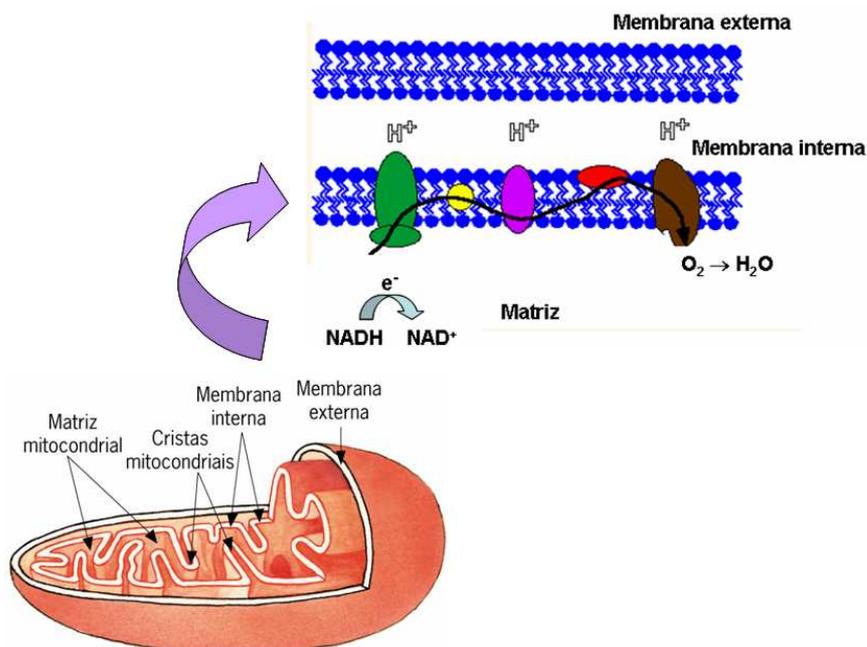


Figura 10: Representação do bombeamento de prótons que ocorre na mitocôndria.⁵⁷

Uma das estratégias que vem sendo adotada para melhorar a seletividade do fotossensibilizador pelo tecido alvo envolve sua encapsulação em sistemas carregadores, como lipossomos, partículas poliméricas, micelas e etc, conforme será abordado no item seguinte.

1.6. Veículo carregador em Terapia Fotodinâmica

As formas farmacêuticas de liberação imediata como os comprimidos e as cápsulas atualmente dominam o mercado farmacêutico e a administração oral continua sendo a via de administração mais comum. Entretanto, é de grande interesse que as formas farmacêuticas liberem o fármaco na quantidade, no local e no momento adequados. Assim, as estratégias que prolongam o tempo de ação,

reduzem a freqüência de administração e que promovem a incorporação do fármaco apenas no local desejado têm recebido grande atenção.

Conforme discutido no item 1.4, existem caminhos que contribuem para o desenvolvimento da TFD. Enquanto a descoberta de FS novos e mais potentes continua em desenvolvimento, muita atenção vem sendo dada à utilização de veículos carregadores, que tem contribuído para aumentar a eficiência dos FS e, conseqüentemente, o progresso da TFD.

Através de um levantamento realizado na *web of science*,⁵⁸ relacionando os tópicos *Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica) e *Drug Delivery* (Veículo Carregador), é possível verificar um crescente interesse e importância destas áreas de pesquisa, caracterizados, principalmente, por um aumento no número de publicações a partir do ano 2000 e de grupos que acreditam no papel dos veículos carregadores em TFD.

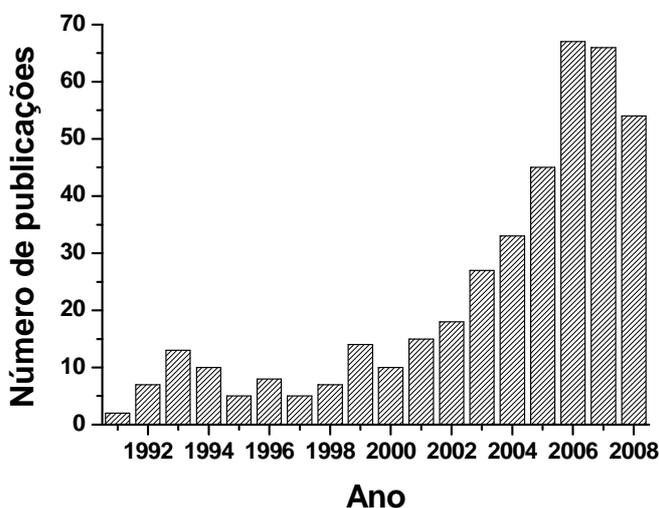


Figura 11: Número de publicações envolvendo os temas *Photodynamic Therapy and Drug Delivery* por ano. Fonte: *Web of science* – outubro de 2008.

Para ser aplicável em TFD, o sistema carregador ideal deve permitir o acúmulo seletivo do FS dentro do tecido doente, para que ocorra pouca ou nenhuma retenção pelas células sadias. Além disso, os carregadores devem ser capazes de

incorporar o FS sem causar perda ou alteração da sua atividade. Levando-se em conta a grande probabilidade de haver reaplicação, o veículo empregado deve ser biodegradável e apresentar baixa ou nenhuma imunogenicidade.¹¹

Outra razão para se utilizar veículos carregadores é proporcionar um ambiente onde o FS possa ser administrado em sua forma monomérica.^{11,59,60} Muitos fotossensibilizadores tendem a agregar em meio aquoso devido à sua estrutura química, e esta característica é um dos fatores que diminui a sua eficiência *in vivo*, pois ocasiona uma diminuição da biodisponibilidade e limitação das propriedades fotofísicas, como conversões internas não radioativas, diminuição do tempo de vida do estado triplete e redução da capacidade de fotoexcitação.^{11,21}

A retenção dos fotossensibilizadores pelas células tumorais pode ser aumentada mediante o emprego de veículos carregadores que têm afinidade pelo tecido alvo.⁶⁰ Exemplos destes veículos são lipossomos, os conjugados e os géis poliméricos, as micelas e as partículas poliméricas (micro e nano).^{11,61,62,63}

Nesta tese as nanopartículas poliméricas foram escolhidas como veículo carregador, pois este tipo de sistema vem sendo muito estudado e pode ser considerado um carregador promissor para a veiculação de FS e demais fármacos para uma liberação sustentada e seletiva. As nano e micropartículas são carregadores sólidos que contêm um fármaco encapsulado (incorporado) em sua estrutura e que oferecem vantagens em relação aos demais veículos.⁶⁴ Os lipossomos, por exemplo, apresentam limitações como curto tempo de vida e instabilidade física e química em ambiente biológico.^{39,65} As vantagens apresentadas pelas partículas poliméricas são:^{39,64,65}

a) as características físico-químicas permanecem inalteradas por longos períodos, permitindo maiores tempos de estocagem,

- b) podem ser administradas via diferentes rotas (oral, nasal, pulmonar, tópica, intramuscular ou subcutânea). Além disso, se apresentarem diâmetro da ordem de nanômetros, as partículas podem ser administradas pela via endovenosa,
- c) são passíveis de produção em larga escala,
- d) elevada eficiência de encapsulação,
- e) uma grande variedade de materiais pode ser empregada como carregadores.

O FS não deve ser citotóxico na ausência de luz e, desta forma, somente as áreas irradiadas serão afetadas, mesmo que o FS tenha infiltrado em células saudáveis.^{25,50} Esta seletividade, como já foi mencionado, pode ser aumentada pela incorporação de fotossensibilizadores em veículos carregadores ou pela conjugação destes com agentes-alvos ou carboidratos, que possuem elevada afinidade pelo tecido doente, principalmente os neoplásicos.²⁵ Além disso, as nanopartículas podem acumular no tumor devido a atividade endocitótica aumentada e danos na vasculatura do tumor.⁶⁶

Outro benefício proporcionado pelos veículos carregadores em TFD é o aumento do efeito fototóxico, conforme demonstrado por Konan e colaboradores. Eles relataram a encapsulação da meso-tetra(hidroxifenil) porfirina (p-THFP) em nanopartículas de PLGA (poli(ácido lático-co-ácido glicólico)) e de PLA (poli(ácido lático)). Neste estudo, o ensaio de terapia fotodinâmica foi realizado em células EMT-6 de tumor mamário de rato e a atividade fotodinâmica da p-THFP incorporada nas nanopartículas foi comparada com a da p-THFP livre.²² Foi observado que, embora os processos de entrada e localização na célula tenham sido similares, todas as formulações de p-THFP incorporada nas nanopartículas apresentaram fototoxicidade maior do que a p-THFP livre e na mesma concentração. Este efeito

ocorreu devido a uma maior retenção das formulações nanoparticuladas em relação a p-THFP livre.

Roby *e colaboradores* e Vargas *e colaboradores*, também relataram que porfirinas encapsuladas exibem a atividade terapêutica maior do que a respectiva porfirina livre.^{20,39}

Considerando-se os benefícios que a encapsulação de FS em partículas poliméricas pode trazer para a TFD, a verteporfirina, ou monoácido derivado de benzoporfirina, (Figura 7a) foi o primeiro FS encapsulado (Visudyne) em lipossomo aprovado pelo FDA para o tratamento da degeneração macular da retina.³⁹

O termo nanopartícula, aplicado à liberação controlada de fármacos, é amplo e refere-se a partículas com tamanho menor que 1 μm (principalmente de 1 – 200 nm) e a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas.^{67,68} Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, onde é possível se identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (Figura 12).^{69,70}

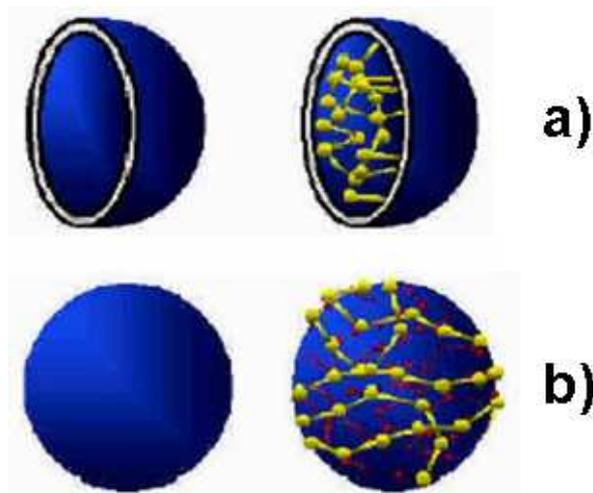


Figura 12: Representação esquemática de a) um sistema reservatório (nanocápsula) e b) um sistema matriz (nanoesfera).⁷¹

Inúmeros métodos permitem encapsular um material ativo. A diferença básica entre estes métodos está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, sendo que a combinação entre o material e o agente pode ser de natureza física, química ou físico-química. Entre os métodos físicos, um dos mais conhecidos é o *spray drying* e esta foi a técnica escolhida neste trabalho de doutorado.⁷² Para a produção das nanopartículas, polímeros biocompatíveis e biodegradáveis têm sido preferencialmente empregados, uma vez que são eliminados do corpo como pequenos fragmentos não-tóxicos.⁷³ Entende-se como biocompatível, todo material que pode ser implantado ou colocado em contato com tecidos ou órgãos do corpo humano sem provocar qualquer tipo de reação adversa ao organismo por rejeição ou contaminação. Já a palavra biodegradável, compreende todo material que degrada em fragmentos menores e pode ser excretado pelo corpo. Estes produtos de degradação não são tóxicos e não devem criar nenhuma resposta inflamatória.

Os únicos polímeros aprovados pelo FDA são os polímeros de ácido PLA, ácido glicólico (PLG) e o copolímero PLGA. Porém, estes polímeros têm custos

muito levados. Para se ter uma idéia, cada grama do PLGA (50:50) que é amplamente relatado na literatura custa R\$ 330,00 reais.⁷⁴ Nesta tese, polissacarídeos foram propostos e utilizados como polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. A quitosana e a dextrina foram os polissacarídeos escolhidos e o grama de cada polímero é, respectivamente, R\$ 0,08 e 0,30 reais.⁷⁵ Além da biocompatibilidade, a seleção destes polímeros foi baseada na importância de serem economicamente viáveis, pois sendo de baixo custo possibilitou a realização de vários experimentos para o desenvolvimento do *spray dryer*, conforme será discutido no 3.1, e poderiam gerar produtos mais acessíveis à população. A solubilidade destes polissacarídeos em meio aquoso também foi uma característica relevante na escolha, pois o *spray dryer* projetado pelo grupo contém partes que podem ser atacadas por solventes orgânicos.

1.6.1. Polissacarídeos Naturais

Os carregadores comumente utilizados no processo de veiculação de fármacos incluem os carboidratos. Em particular, nanopartículas baseadas em polissacarídeos naturais têm ganhado mais atenção no desenvolvimento de sistemas carregadores de bioativos, por serem flexíveis em relação ao perfil de liberação desejável e custo-efetivos. Além disso, as matrizes de polissacarídeos biodegradáveis são interessantes, pois apresentam uma elevada capacidade de incorporação, baixa imunogenicidade e excelente biocompatibilidade, uma vez que são degradados a produtos naturais no corpo humano.^{76, 77}

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza e são definidos, quimicamente, como poli-hidroxi-cetonas ou poli-hidroxi-aldeídos. Certos carboidratos, como o amido, são a base da nutrição humana e a oxidação destes

compostos é a principal via metabólica fornecedora de energia em muitas células. Os carboidratos formam compostos pela união de duas ou mais moléculas de monossacarídeos, sendo classificados como dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são unidos covalentemente entre si por uma ligação glicosídica na forma α ou β . Os carboidratos são estáveis em meio básico, porém são relativamente instáveis em meio aquoso ácido, meio no qual sofrem hidrólise com relativa facilidade.^{78,79}

Um dos polissacarídeos utilizados nesta tese foi a dextrina (Figura 13), que é um polímero linear, obtido através da hidrólise ácida do amido e composto por unidades de D-glicose unidas por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$).

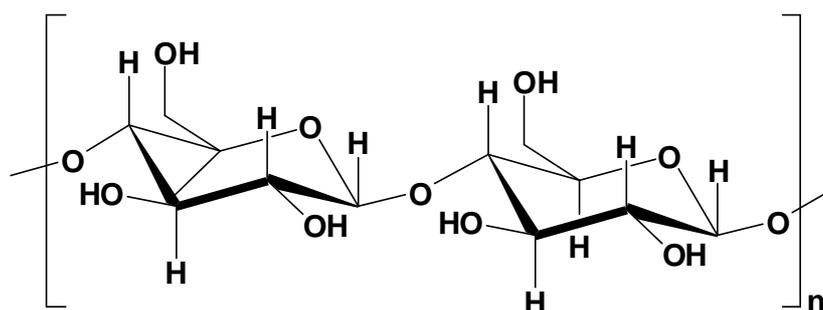


Figura 13: Estrutura molecular da dextrina.

O outro polissacarídeo empregado como matriz polimérica nesta tese foi a quitosana, ou poli[β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glicopirano], é um polissacarídeo biodegradável constituído por dois monossacarídeos, a β -D-glicosamina e a N-acetil- β -D-glicosamina, unidos por ligação glicosídica β (1-4).^{80,81} É obtida pela desacetilação alcalina da quitina, que é um polissacarídeo de ocorrência natural na estrutura esquelética de muitas classes que compõem o grupo dos invertebrados (Figura 14a,b).^{82,83,84} A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante, ficando atrás apenas da celulose.⁸⁵ Na reação de desacetilação o grupo acetamido

da quitina pode ser convertido no grupo amino para produzir a quitosana (Figura 15).⁸⁶

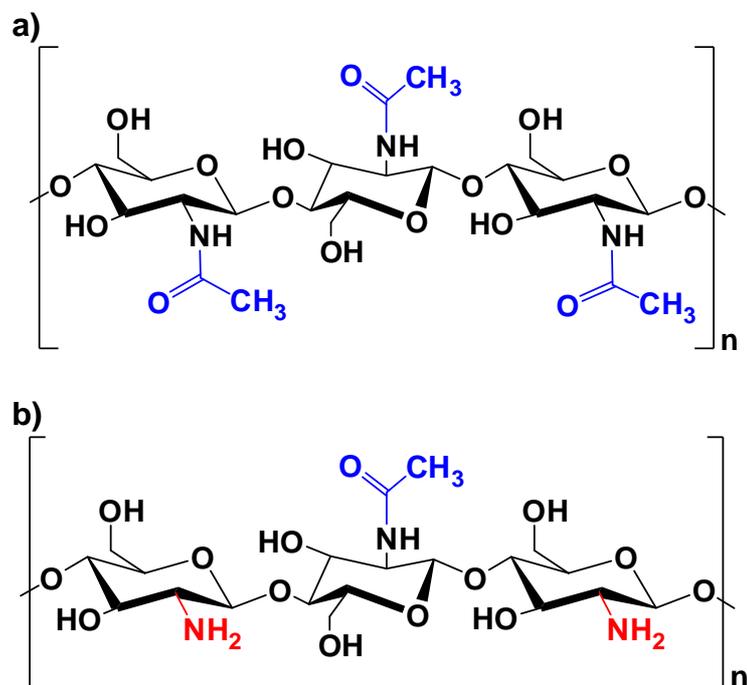


Figura 14: Estruturas moleculares da a) quitina e b) quitosana.

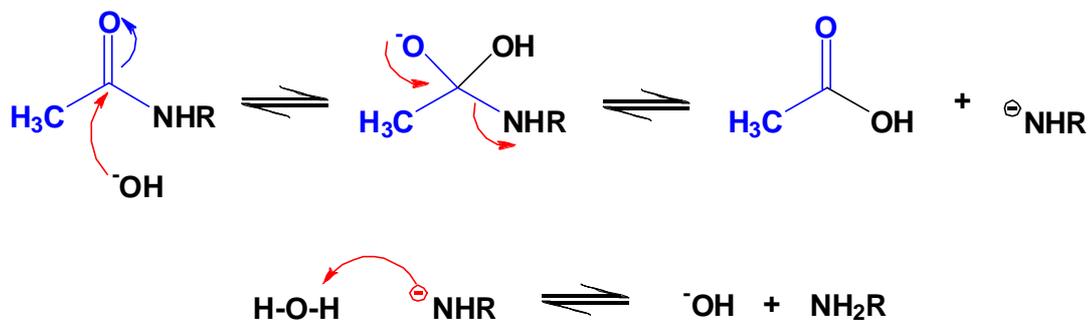


Figura 15: Mecanismo simplificado da reação de desacetilação alcalina da quitina.

A quitosana encontra muitas aplicações nas áreas farmacêutica e biomédica e, por isso, tem sido extensivamente revisada na literatura. A quitosana tem sido estudada como veículo carregador de fármaco, na produção de membranas para a regeneração da pele e como aditivo alimentar para redução de peso (diminuindo a absorção de gorduras).⁸⁷ Esta potencialidade é devida à suas favoráveis

características como não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades bioadesivas.^{88,89} A quitosana não provoca reações alérgicas ou rejeições, uma vez que é degradada lentamente para produtos “inofensivos” (aminoaçúcares) que podem ser incorporados pelo corpo humano, através das vias metabólicas, ou excretados (Figura 16).^{77,78,86} Esta degradação ocorre devido a susceptibilidade da quitosana ser hidrolisada por enzimas, como a lisozima. Entretanto, o mecanismo de degradação ainda não está completamente elucidado.⁹⁰

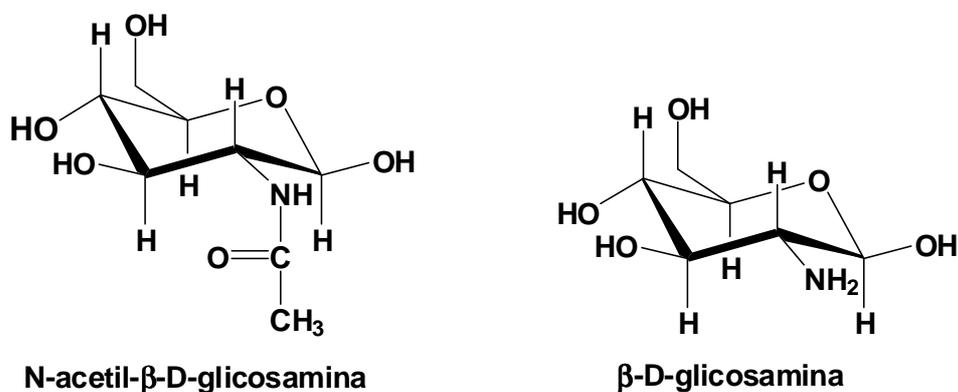


Figura 16: Produtos de degradação da quitosana.

Embora a solubilidade da quitosana seja influenciada pela massa molecular, a extensão da desacetilação também tem efeito na solubilidade do polímero. O grau de desacetilação aumenta o número de grupos amino livres (-NH₂), que modificam as interações hidrofóbicas com a água.⁸² A quitosana é uma base Brønsted-Lowry fraca com um valor de pKa do resíduo β-D-glicosamina em torno de 6,2 – 7,0, sendo, portanto, insolúvel em soluções neutras e alcalinas. Entretanto, em soluções ácidas este polissacarídeo forma sal através da protonação dos grupos amino, resultando na formação de um polímero solúvel e positivamente carregado.⁹¹ Esta protonação em pH ácido foi importante neste projeto, pois permitiu a solubilização da quitosana

em meio aquoso, podendo, portanto, ser escolhida como matriz polimérica. Além disso, sua insolubilidade em pH fisiológico possibilitou uma liberação controlada, conforme será demonstrado no item 4.8.

1.7. Técnicas de encapsulação - *Spray Drying*

A técnica de encapsulação surgiu da idealização do modelo celular. Neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce, ao mesmo tempo, outras funções, como controlar a entrada e saída de material da célula.⁷² De maneira semelhante, a encapsulação é uma técnica em que uma membrana (agente encapsulante), geralmente um polímero, envolve pequenas partículas de compostos sólidos ou líquidos, com o objetivo de oferecer proteção ao material ativo do meio circundante, como efeitos indesejados de temperatura, pH e incompatibilidades químicas, modificar características físicas e químicas, prevenir a perda de voláteis e controlar a liberação.^{80,92,93,94}

Existem vários métodos de encapsulação, como, por exemplo, coacervação,⁹⁵ nanoprecipitação,⁹⁶ emulsão-evaporação de solvente⁹⁷ e *spray drying*⁹⁸. De maneira geral, o método escolhido deve manter a estabilidade e função do material ativo e ser reprodutível.⁸⁰ A técnica de *spray drying* foi escolhida neste projeto por ser fácil de operar e ser passível de aplicação em larga escala.

Spray drying é, freqüentemente, considerado como um processo de desidratação empregado com sucesso nas Indústrias Química e Alimentícia para a secagem de amostras fluidas, levando à produção, por exemplo, de leite em pó, sopas instantâneas, sucos e detergentes.⁹⁹ Entretanto, a técnica *spray drying* é uma tecnologia importante e que está sendo amplamente empregada nas áreas farmacêutica e bioquímica e na indústria de alimentos, como método de

encapsulação, uma vez que o material ativo é aprisionado fisicamente dentro de uma matriz protetora, que é essencialmente inerte ao material a ser encapsulado.^{100,98}

O processo *spray drying* (nebulização e secagem) envolve a transformação de um material de partida no estado fluido (solução, emulsão, suspensão ou pasta) para um material particulado seco, através da nebulização do fluido num meio de secagem aquecido (Figura 17).¹⁰¹ Esta técnica envolve a evaporação do solvente do material através da mistura da névoa com o ar aquecido. O processo completo de *spray drying* consiste basicamente na seqüência de quatro processos: nebulização do material de partida (alimentação), mistura da névoa com o ar, evaporação e separação do material particulado seco.^{100,102,103,104}



Figura 17: Representação ilustrativa do processo *spray drying*.

Na nebulização a alimentação é dividida em muitas nano/microgotas. Assim, a área superficial do líquido é grande, proporcionando uma boa troca de calor.¹⁰⁴ Desta forma, a evaporação do solvente é rápida e a temperatura das gotas é mantida abaixo da temperatura do ar de secagem, por isso, o processo *spray drying* pode ser aplicado para materiais sensíveis ou não à temperatura.¹⁰⁵

A seleção do nebulizador é uma das mais importantes escolhas na montagem de um *spray dryer* e tem efeito significativo sobre a distribuição das partículas secas. Os nebulizadores comuns são: disco rotativo, bico pressurizado e pneumáticos (duplo fluido).¹⁰² Entretanto, a nova técnica de *spray drying* consiste na nebulização da alimentação fluida através de um nebulizador ultra-sônico.¹⁰³ Desta maneira, as gotículas são geradas por cavitação.

Vários fatores podem afetar a morfologia das partículas produzidas por *spray drying*. Entre eles, podem ser citadas a temperatura, a concentração da solução, o fluxo do gás de arraste, o tempo de evaporação do solvente e o tempo de difusão do solvente.¹⁰⁶ Dentre estes fatores, o efeito da concentração da solução polimérica no tamanho das partículas de dextrina foi estudado nesta tese.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Projetar e desenvolver um equipamento *spray dryer* (de baixo custo) com nebulizador ultrasônico,
- 2) Encapsular porfirinas em nanoesferas de polímeros biodegradáveis por *spray drying*,
- 3) Avaliar a morfologia e a distribuição de tamanho das nanoesferas obtidas,
- 4) Determinar a porcentagem de porfirina associada às nanoesferas e a eficiência de encapsulação,
- 5) Estudar a cinética de liberação do fotossensibilizador a partir das nanoesferas,
- 6) Avaliar a citotoxicidade e fotocitotoxicidade das nanoesferas de quitosana, da TMPyP livre e da TMPyP incorporada em nanoesferas de quitosana utilizando células neoplásicas da linhagem J774-A1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento de um spray dryer

Os objetivos principais desta tese de doutorado foram projetar e desenvolver um equipamento *spray dryer* e encapsular porfirinas em nanoesferas de polímeros biodegradáveis por *spray drying*.

Para esta etapa de desenvolvimento, a dextrina (Figura 13) foi utilizada como matriz polimérica por ser biodegradável, biocompatível e, principalmente, economicamente viável.

Os principais componentes de um equipamento padrão de *spray dryer* incluem o aquecedor de ar, bomba peristáltica, nebulizador, câmara de secagem, o ciclone e um recipiente para coletar o produto seco (Figura 18). Em nosso laboratório estavam disponíveis as seguintes partes: um sistema de ultra-som (Nevoni[®], 1,66 MHz) empregado como nebulizador por ultra-som, um micro-compressor (Vigo[®] Ar) utilizado para carregar as gotas formadas através da câmara de secagem e um forno tubular com duas zonas de temperatura (EDG[®], 10P-S) usado como câmara de secagem. Para montarmos nosso *spray dryer* foi necessário projetar a disposição dos componentes e o sistema de coleta do material seco.

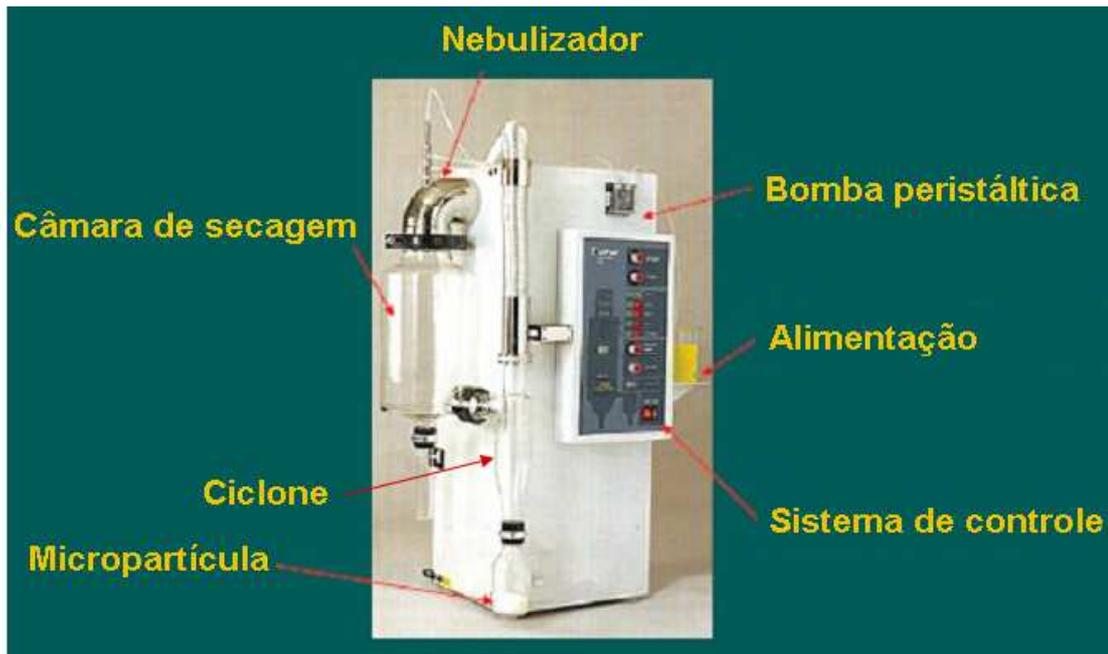


Figura 18: Representação de um *spray dryer* comercial e suas respectivas partes.

Até atingirmos a disposição adequada, foram projetadas várias configurações na tentativa de produzir esferas de dextrina. As diferenças entre estas configurações estavam relacionadas às seguintes variações:

- Temperaturas de entrada e saída do forno;
- Posições (horizontal, ligeiramente inclinado, ou vertical) do forno e do ultra-som gerador das gotas;
- Concentração da solução de polímero;
- Sistema de coleta das partículas produzidas;
- Presença ou ausência de manta de aquecimento com diferentes temperaturas;
- Dimensões do tubo de vidro interno da câmara de secagem.

Em seguida serão apresentadas as várias configurações montadas e as condições utilizadas:

1º Experimento:

A alimentação do sistema foi composta uma solução aquosa de dextrina $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e o aparelho utilizado foi montado da seguinte maneira:

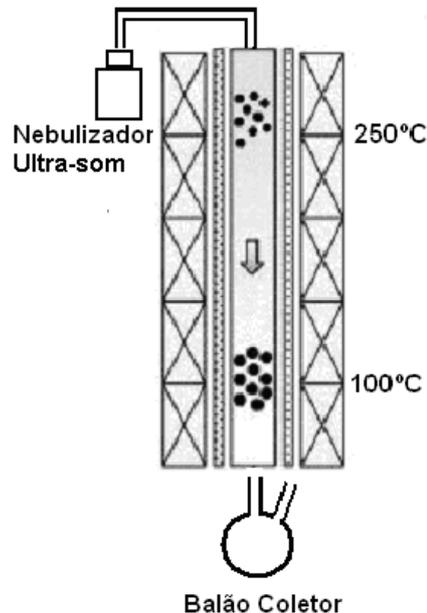


Figura 19: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanoesferas de dextrina.

Na Figura 19, é possível verificar que o forno tubular foi disposto na vertical, a nebulização foi realizada de cima para baixo em co-corrente com o fluxo de ar quente, a temperatura de entrada (T_e) foi 250°C , a temperatura de saída (T_s) foi 100°C e um balão de fundo redondo de duas bocas e com capacidade para $100,0 \text{ mL}$ foi utilizado como recipiente coletor do material seco.

No processo, foram adicionadas alíquotas de $10,0 \text{ mL}$ da solução de dextrina nebulizador por ultra-som e ao todo foram nebulizados $50,0 \text{ mL}$ de solução.

Com esta montagem e condições escolhidas não foi possível obter material seco no sistema coletor, pois o vapor de água condensou dentro do balão.

2º Experimento:

A única diferença entre o 1º e 2º experimentos foi a concentração da solução polimérica, que neste caso foi 4,0 mg.mL⁻¹.

Novamente as condições escolhidas não foram adequadas para a produção de partículas secas, pois o vapor de água condensou dentro do balão.

3º Experimento:

A solução de dextrina preparada, as temperaturas escolhidas e a posição da aparelhagem foram iguais ao 1º experimento. Entretanto, no balão de duas bocas foi colocada uma manta de aquecimento, cuja temperatura foi mantida a 70°C.

Não foi possível produzir partículas secas, pois o vapor de água condensou e ficou retido no balão coletor.

4º Experimento:

A única diferença entre esta tentativa e a 3ª tentativa foi a temperatura da manta, que neste caso foi 120°C. Foi utilizada uma temperatura maior que o ponto de ebulição da água para impedir que esta condensasse e ficasse retida no balão. Entretanto, devido à temperatura da manta e ao tempo do experimento, a dextrina retida no balão coletor degradou, não sendo possível obter partículas.

5º Experimento:

A solução de dextrina preparada, o volume total nebulizado e as temperaturas escolhidas foram iguais à 1ª tentativa. Entretanto, o equipamento foi utilizado de modo que o forno tubular ficasse numa posição inclinada em, aproximadamente, 45°.

Não foi possível produzir partículas de dextrina, pois o vapor de água condensou e ficou retido no balão coletor.

6º Experimento:

A solução de dextrina preparada e as temperaturas de entrada e de saída foram iguais à 1ª tentativa. Entretanto, a posição do equipamento foi alterada para a seguinte maneira:

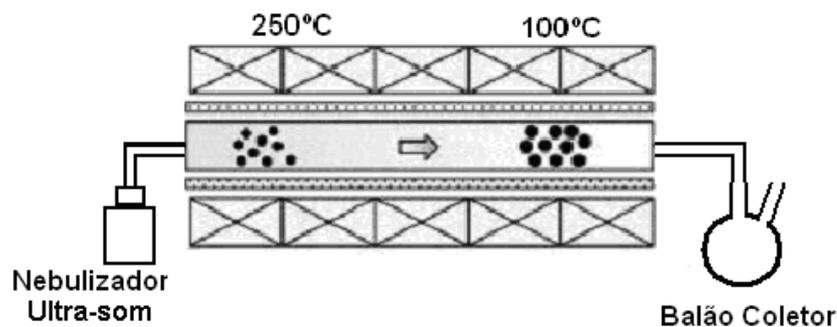


Figura 20: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanoesferas.

Não foi possível produzir partículas de dextrina, pois o vapor de água condensou e ficou retido no balão coletor.

7º Experimento:

A solução de dextrina preparada e as temperaturas de entrada e de saída foram iguais à 2ª tentativa. Entretanto, a posição do equipamento foi alterada para a posição semelhante ao esquema da Figura 20.

Esta configuração e as condições escolhidas não foram suficientes para evitar que o vapor de água condensasse e ficasse retido no balão coletor, impossibilitando a obtenção das partículas de dextrina.

8º Experimento:

Como se pode observar na Figura 20, uma grande parte do tubo ficou fora do forno na entrada e na saída. Assim, parte da solução acabou acumulando antes da entrada e antes do balão de coleta. Foi decidido, portanto, colocar o nebulizador bem próximo à entrada do forno. Com isso, uma parte maior do tubo ficou para fora na saída do forno e, para manter esta extremidade aquecida, foi enrolada uma fita de aquecimento mantida a 100°C.

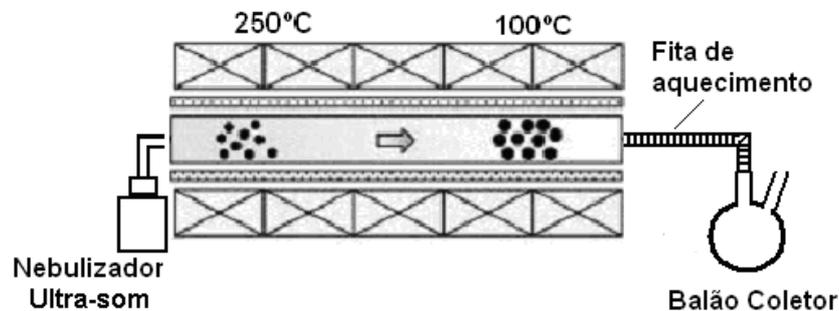


Figura 21: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanopartículas, com a fita de aquecimento na saída do forno.

Neste caso, de maneira semelhante aos demais experimentos, o vapor de água condensou e ficou retido no balão coletor.

9º Experimento:

Para não utilizar mais a fita de aquecimento e simplificar o sistema da Figura 21, o tubo de vidro foi reduzido ao tamanho do forno. Além disso, as temperaturas de entrada e saída foram alteradas para 280°C e 265°C, respectivamente. A concentração da solução aquosa de dextrina foi 4,0 mg mL⁻¹.

Após nebulizar toda a solução, foi possível recolher amostra de dextrina seca no balão coletor. Entretanto, a quantidade recuperada (~1% em massa) foi muito pequena e concluiu-se que o restante da dextrina foi carregado pelo vapor de água.

10º e 11º Experimento:

Com a obtenção de material seco após a nebulização na 9ª tentativa, foi decidido repetir o mesmo procedimento mais duas vezes para verificar a massa de dextrina recuperada. Novamente, a quantidade de dextrina seca em cada tentativa foi 1% da massa inicial.

12º Experimento:

Nesta tentativa, a concentração da solução polimérica utilizada foi $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o aparelho foi montado conforme esboçado na Figura 22. Nesta configuração, o forno tubular voltou para a posição vertical, o nebulizador foi conectado diretamente ao tubo de vidro interno, permitindo gerar a névoa da solução de dextrina dentro do forno, e no balão coletor foi colocado um intermediário de rotaevaporador para que este atuasse como *trap* de segurança, impedindo que o vapor de água condensado retornasse ao balão coletor.

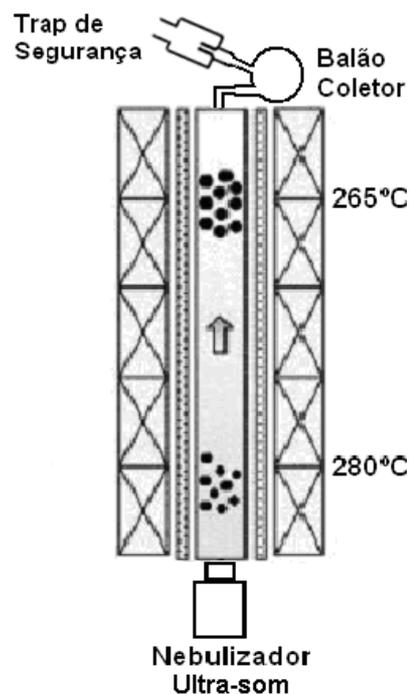


Figura 22: Esquema da aparelhagem utilizada na produção de nanoesferas.

A temperatura de entrada utilizada foi 280°C e a temperatura de saída foi 265°C. Alíquotas de 10,0 mL de solução foram adicionadas ao sistema de ultra-som e ao foram nebulizados 50,0 mL.

No balão coletor foi possível recuperar uma pequena quantidade de dextrina seca (~2,5 % em massa), que foi caracterizada morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV). No *trap* de segurança ocorreu a condensação do vapor de água. Esta água foi transferida para um béquer, previamente pesado, e aquecida a 100°C. Quando a água evaporou completamente, a dextrina que estava dissolvida foi pesada e a massa correspondente era 53% da massa inicial. Assim, foi concluído que o restante de dextrina foi carregado junto com o vapor de água que não condensou no *trap* de segurança.

Após montar o equipamento conforme demonstrado na Figura 22 e analisarmos seu funcionamento, verificamos que estávamos próximos de conseguir elaborar um sistema que separasse o vapor do pó formado, função esta que é realizada pelo ciclone no *spray dryer* comercial, e aumentar a recuperação do material seco.

13º Experimento: configuração final

A configuração final (Figura 23) foi obtida através do uso de uma solução aquosa de dextrina na concentração 20,0 mg mL⁻¹. As temperaturas de entrada e de saída foram 280°C e 275°C, respectivamente.

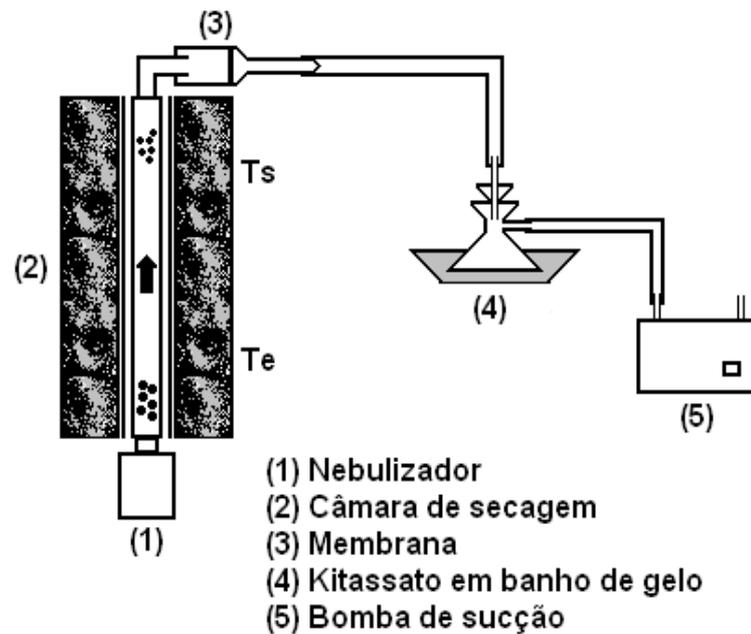


Figura 23: Esquema do *spray dryer* desenvolvido para a realização das encapsulações.¹⁰⁷

O sistema desenvolvido para coletar as partículas formadas é apresentado na Figura 23 e consistiu de uma membrana de celulose (Millipore[®], porosidade 0,025 μm) suportada sobre um funil de placa sinterizada. Uma bomba de sucção (68 W - Heidolph[®]) foi empregada para separar o ar do pó e um kitassato, inserido num recipiente contendo gelo, utilizado para reter o vapor condensado. Ou seja, as partículas secas ficaram retidas na membrana e o vapor de água foi retirado do sistema através da bomba de sucção e condensado no kitassato.

Após a nebulização, a massa de dextrina recuperada na membrana foi 70% da massa inicial. Esta recuperação foi considerada satisfatória e, portanto, a montagem do *spray dryer* estava finalizada. O equipamento desenvolvido foi reportado na literatura.¹⁰⁷

As partículas de dextrina foram caracterizadas por MEV, microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise termogravimétrica (TGA), análise térmica diferencial (DTA), difração de raio-x pelo método do pó (DRX) e espectroscopia de

energia dispersiva (EDS). Como padrão, a dextrina de partida foi analisada por MEV, TGA, DTA e DRX.

3.2. Metodologia utilizada para a determinação do diâmetro médio das partículas produzidas

É comum encontrarmos na literatura a utilização da técnica por espalhamento de luz laser para a determinação do tamanho de partículas. Assim, a amostra de dextrina obtida no 13º experimento descrito no item 3.1 foi, inicialmente, analisada por esta técnica. Porém, o resultado não passou no índice de polidispersão e alguns ciclos durante as medidas foram descartados pelo próprio equipamento. Decidimos, portanto, avaliar o tamanho de partícula através da análise de, aproximadamente, 1000 partículas presentes nas imagens de MEV utilizando o programa *Image J*.¹⁰⁸ Os valores dos diâmetros médios obtidos pelos dois métodos foram diferentes.

Com o intuito de verificar se esta diferença ocorreria em outras amostras e encontrar uma justificativa para esta divergência, foram preparadas partículas por *spray drying* a partir de soluções aquosas de dextrina de diferentes concentrações (2,0 mg mL⁻¹; 4,0 mg mL⁻¹; 8,0 mg mL⁻¹; 12,0 mg mL⁻¹ e 16,0 mg mL⁻¹). As demais condições experimentais foram análogas às descritas no 13º experimento do item 3.1 e o diâmetro médio de cada uma destas amostras foi determinado pelos dois métodos.

Após este estudo comparativo entre os métodos, decidiu-se utilizar a análise das imagens de MEV pelo programa *Image J* para determinar o diâmetro médio das demais nanoesferas produzidas neste trabalho de doutorado.

3.3. Estabelecimento de uma metodologia de encapsulação por spray drying

Uma vez desenvolvido o *spray dryer* e verificada sua eficiência em produzir partículas de dextrina com morfologia esférica, foi necessário iniciar estudos para avaliar a aplicabilidade deste equipamento e das condições escolhidas (temperaturas, concentração da solução e proporção porfirina/polímero) para a realização dos experimentos de encapsulação de porfirinas em matrizes poliméricas, que foi o objetivo principal do trabalho.

O *spray dryer* projetado é composto por algumas partes atacáveis por solventes orgânicos e esta condição implicou na necessidade de serem utilizados polímeros e porfirinas hidrofílicos. Partindo-se desta premissa, foram realizadas duas encapsulações utilizando-se a dextrina como matriz polimérica e MnTPPS₄ e a TPPS₄, ambas solúveis em água, como materiais ativos.

3.3.1. Síntese e caracterização da MnTPPS₄

Embora o objetivo principal deste trabalho fosse encapsular porfirinas, decidimos iniciar estes estudos realizando a incorporação de MnTPPS₄ em esferas de dextrina, pois a intenção foi utilizar o íon Mn(III) como sonda espectroscópica, permitindo localizar a esta metaloporfirina nas partículas. Porém, foi inicialmente necessário realizar a síntese da MnTPPS₄. Esta metaloporfirina foi obtida a partir da metalação da TPPS₄ com manganês metálico segundo metodologia de inserção heterogênea de metal, descrita por Herrmann e colaboradores (Figura 24).¹⁰⁹

Em um balão de fundo redondo de três bocas e capacidade de 50,0 mL, foram adicionados 32,0 mL de água Milli Q e 1,6 g ($2,9 \cdot 10^{-2}$ mol) de manganês

metálico em escamas (Química Especializada Erich LTDA[®]). Esta mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento constantes. Após atingir a temperatura de refluxo, 30,7 mg ($3,3 \cdot 10^{-5}$ mol) de TPPS₄ (MidCentury[®]) foram adicionados. A reação foi processada durante 27 horas e acompanhada por espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível (espectroscopia UV-Vis) e cromatografia de camada delgada (CCD).

Ao término da reação, a mistura final foi filtrada utilizando-se uma membrana de celulose (Schleicher & Schuell[®], porosidade 0,2 μm), para remover o excesso de Mn metálico. O rendimento desta reação foi 87,3%.

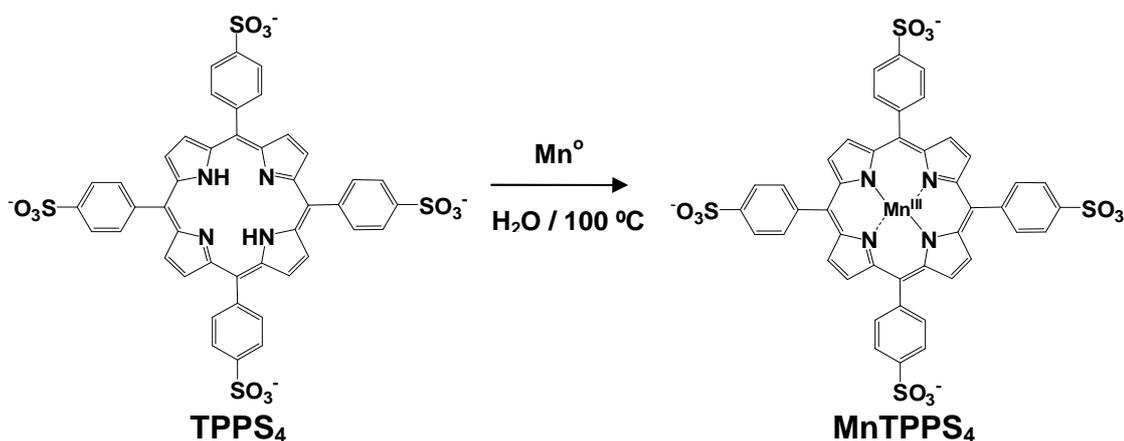


Figura 24: Reação de inserção de Mn(III) na TPPS₄.

A MnTPPS₄ foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis.

3.3.2. Encapsulação da MnTPPS₄

A encapsulação da MnTPPS₄ em dextrina por *spray drying* foi realizada preparando-se a alimentação do *spray dryer* com uma solução aquosa de dextrina 20,0 mg mL⁻¹ e dissolvendo uma massa de MnTPPS₄ igual 1% da massa de dextrina. O pó obtido foi caracterizado por MEV, MET e EDS.

A encapsulação foi realizada com o aparelho montado da maneira ilustrada na Figura 23. As temperaturas de entrada e saída escolhidas para a câmara de secagem foram 280°C e 275°C, respectivamente.

3.3.3. Encapsulação da TPPS₄

A encapsulação da TPPS₄ por *spray drying* em esferas de dextrina foi realizada preparando-se a alimentação do *spray dryer* com uma solução aquosa de dextrina 20,0 mg mL⁻¹ e massa de TPPS₄ igual 1% da massa de dextrina. O pó obtido foi caracterizado morfológicamente por MEV e MET.

O procedimento e as condições experimentais foram os mesmos descritos no item 3.3.2.

3.3.4. Porcentagem de TPPS₄ e de MnTPPS₄ associada às nanoesferas de dextrina e eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação e a porcentagem de porfirina ou metaloporfirina nas nanoesferas de dextrina foram determinadas. Para isso, 3 amostras (10,0 mg cada - experimento em triplicata) de cada um dos compostos de encapsulação foram analisadas. Estas amostras foram suspensas em 1,0 mL de metanol e em seguida centrifugadas. O metanol, contendo a porfirina ou a metaloporfirina que não foi encapsulada, foi removido e evaporado. A porfirina/metaloporfirina foi re-dissolvida em 1,0 mL de água destilada e analisada por espectroscopia UV-Vis. Esta “lavagem” das partículas foi realizada somente uma vez no caso da MnTPPS₄ e 4 vezes no caso da TPPS₄.

As nanoesferas, após serem lavadas com metanol, foram dissolvidas com 1,0 mL de água destilada e centrifugadas para separar o polímero. A TPPS₄ e a MnTPPS₄ presentes no interior das nanoesferas também foram analisadas por espectroscopia UV-Vis.

A quantificação da metalo e da porfirina encapsuladas ou não, foi realizada com o auxílio das respectivas curvas de calibração obtidas pelo método de adição padrão.

Após este experimento, a eficiência de encapsulação e a porcentagem de TPPS₄ e de MnTPPS₄ associadas em nanoesferas de dextrina foram obtidas a partir das seguintes equações:

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{Massa de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) dentro das microesferas}}{\text{Massa de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) dentro + massa de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) fora das microesferas}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Eficiência de encapsulação teórica} = \frac{\text{Massa de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) dentro das microesferas}}{\text{Massa de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) utilizada}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\% \text{ de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) associada às microesferas} = \frac{\text{Massa de TPPS}_4 \text{ (ou MnTPPS}_4\text{) presente na massa de partículas}}{\text{Massa de partículas}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

3.4. Estudo espectroscópico da TPPS₄ encapsulada em nanoesferas de dextrina

Antes de realizar a encapsulação descrita no item 3.3.3, uma pré-encapsulação da TPPS₄ em dextrina foi realizada com a mesma metodologia descrita no item mencionado. Porém, a porcentagem inicial de TPPS₄ foi 0,8% e após o processo *spray drying* a porcentagem determinada desta porfirina nas partículas foi 0,7%.

Esta encapsulação foi realizada com o objetivo de verificar se o processo de *spray drying* ocasionava alguma mudança estrutural na porfirina e estudar seu estado nas partículas. As propriedades espectroscópicas da TPPS₄ encapsulada em nanoesferas de dextrina foram estudadas e comparadas às propriedades das misturas físicas compostas por TPPS₄ e dextrina.⁵⁹

As misturas físicas foram preparadas da seguinte forma: as proporções em massa de TPPS₄/dextrina escolhidas foram 0,2, 0,3, 0,8 e 1,0%. Cada preparação foi obtida através da adição de polímero e porfirina em uma cápsula de porcelana, seguida da homogeneização com metanol. Posteriormente, a cápsula foi aquecida para promover a evaporação do metanol.

A TPPS₄ encapsulada e presente nas misturas físicas foi analisada por espectroscopia eletrônica de fotoluminescência (espectroscopia de fotoluminescência) e por absorção/reflectância difusa no ultravioleta-visível (absorção/reflectância difusa no UV-Vis).

3.5. Determinação do grau de acetilação da quitosana

Embora a dextrina seja um polímero biodegradável, biocompatível e as encapsulações tenham sido realizadas com sucesso, será discutido no item 4.3.4 a não aplicabilidade deste polímero como veículo carregador por ser hidrofílico. Desta forma, precisávamos de um polímero que fosse possível de ser manipulado em solução aquosa, por causa da restrição do *spray dryer* desenvolvido com relação aos solventes orgânicos, e ao mesmo tempo permitisse uma liberação controlada. Baseados nestas implicações decidimos utilizar a quitosana como matriz polimérica, pois sendo um polímero solúvel apenas em pH ácido, poderia ser utilizada no *spray dryer* e como veículo carregador. Além disso, a quitosana possui características favoráveis como não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

Como foi discutido na introdução, a quitosana é um polímero linear obtido pela desacetilação alcalina da quitina.^{82,83} Na reação de desacetilação o grupo acetamido da quitina pode ser convertido no grupo amino para produzir a quitosana (Figura 15). A relação entre estes grupos no polímero é conhecida como grau de acetilação (GA).

Nesta tese, o grau de acetilação da quitosana foi determinado por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN), seguindo a metodologia descrita na literatura.¹¹⁰ Para isto, aproximadamente 10,0 mg de quitosana (Galena[®]) foram dissolvidas em 1,0 mL de uma solução D₂O/HCl (100:1 v/v). Esta solução foi agitada durante 24 horas na temperatura ambiente e, finalmente, filtrada.

3.6. Produção de nanoesferas de quitosana por spray drying

Foi preparada uma solução $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de quitosana. Para isto, em um béquer de 250,0 mL, 200,0 mg de quitosana foram adicionados a 170,0 mL de água destilada. Para promover a solubilização do polímero o pH da solução foi ajustado para 4,5 com a adição de uma solução de ácido acético $3,4 \text{ mol L}^{-1}$. O volume foi completado com água destilada para 200,0 mL e a solução final obtida foi agitada por 24 horas na temperatura ambiente. Após este período a solução foi filtrada.

A produção das nanoesferas de quitosana foi realizada com o sistema ilustrado na Figura 23. As temperaturas de entrada e saída escolhidas para a câmara de secagem foram 250°C e 245°C , respectivamente. O material seco retido na membrana coletora de celulose foi analisado por MEV, espectroscopia vibracional na região do infravermelho (espectroscopia no infravermelho) e DRX (difratograma apresentado no item 4.7). A quitosana de partida também foi analisada por MEV, espectroscopia no infravermelho e DRX (difratograma apresentado no item 4.7)

3.7. Encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana por spray drying

Antes de iniciarmos a descrição do procedimento experimental adotado na encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana, gostaríamos de relembrar os fatos relatados na literatura e que nos levaram a escolher a TMPyP como uma das porfirinas modelo nos experimentos de encapsulação. De acordo Siboni e colaboradores, a TMPyP é um dos fotossensibilizadores exógenos apropriados para a aplicação em TFD experimental.⁴² Além disso, a literatura reporta um acúmulo

preferencial de fotossensibilizadores catiônicos no interior das mitocôndrias, cuja força motriz é o potencial eletrostático que existe na membrana interna da mitocôndria e que é causado pelo bombeamento de prótons para fora da membrana mitocondrial, gerando um acúmulo de cargas negativas no interior desta organela.^{23,54}

Inicialmente, foi preparada uma solução 1,0 mg mL⁻¹ de quitosana seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.6. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mg de TMPyP na solução de quitosana. A solução final foi mantida sob agitação durante 24 horas e na temperatura ambiente.

A encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana foi realizada com o aparelho montado da maneira ilustrada na Figura 23. As temperaturas de entrada e saída escolhidas para a câmara de secagem foram 260°C e 255°C, respectivamente. O material seco retido na membrana coletora de celulose foi analisado por MEV, DRX e absorção/reflectância difusa no UV-Vis.

3.7.1. Porcentagem de TMPyP associada às nanoesferas de quitosana e eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação e a porcentagem de TMPyP nas nanoesferas de quitosana foram determinadas. Para isso, 3 amostras (8,0 mg cada - experimento em triplicata) foram analisadas. Estas amostras foram suspensas em 1,0 mL de metanol e em seguida centrifugadas. A solução alcoólica contendo a porfirina que não encapsulou foi removida e analisada por espectroscopia eletrônica UV-Vis. Esta “lavagem” das partículas foi realizada 4 vezes.

As nanoesferas, após serem lavadas, foram dissolvidas com 4,0 mL de uma solução de ácido acético pH 3,0, agitadas durante 72 horas à temperatura ambiente,

e centrifugadas para separar a quitosana. A TMPyP presente no interior das nanoesferas também foi analisada por espectroscopia UV-Vis.

A quantificação porfirina encapsulada, ou não, foi realizada com o auxílio das respectivas curvas de calibração (uma solução de ácido acético pH 3,0 e outra em metanol) obtidas pelo método de adição padrão. Após este experimento, a eficiência de encapsulação e a porcentagem de TMPyP associada em nanoesferas de quitosana foram obtidas a partir das equações 1, 2 e 3.

3.8. Avaliação do perfil de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana.

A metodologia desenvolvida para a realização dos experimentos de perfil de liberação foi a seguinte. O estudo foi realizado em triplicata e cada triplicata continha 13 amostras, correspondendo a 13 tempos diferentes de liberação. Desta maneira, foram pesadas 39 amostras (~1,1 mg cada) de nanoesferas e cada uma foi colocada em frascos de vidro fechados e vedados. Em cada amostra foram adicionados 2,0 mL de tampão fosfato de pH 7,4, de modo que a concentração de TMPyP em cada frasco fosse, aproximadamente, $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os frascos foram mantidos sob agitação magnética e na temperatura de 37°C. No tempo de coleta, o conteúdo dos frascos correspondentes àquele tempo foi transferido para *ependorf* e centrifugado, para separar a TMPyP liberada das partículas. A TMPyP liberada foi analisada espectroscopia de fotoluminescência, fixando a excitação em 424 nm, e a porcentagem de porfirina liberada foi determinada com o auxílio de uma curva de calibração obtida pelo método da adição padrão. O tempo total do experimento foi 72 horas.

3.9. Estudos de cito e fotocitotoxicidade das nanoesferas de quitosana, TMPyP livre e TMPyP encapsulada em nanoesferas de quitosana.

Inicialmente, gostaríamos de salientar que estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Professor Dr. Antonio Cláudio Tedesco.

3.9.1. Materiais

Os estudos envolvendo cultura de células macrófagas foram realizados com a linhagem neoplásica de macrófagos J774-A1 (American Type Culture Collection, ATCC). Este tipo de células plasmáticas linfóticas foi obtido originalmente de ratos DBA/2. A indução deste tipo de neoplasma (câncer linfótico) é feita, normalmente, pela injeção de metilcolantreno na cavidade torácica dos ratos. A remoção do fluido, presente na cavidade após dois dias e a transfusão para outros animais, garante a proliferação deste tipo de células. Os estoques primários cultivados em laboratório, a partir das matrizes animais, foram analisados e comercializados pela ATCC.

Para o cultivo da linhagem J774-A1 foi utilizado o meio Dupleco Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM-Gibco) contendo 100 U mL^{-1} de penicilina, $100,0 \cdot 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ de estreptomicina (Gibco), $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ de anfotericina (Gibco), $200,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de glutamina (Gibco), constituído de uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, agindo como uma solução nutritiva. Esse meio é chamado de meio de cultura completo e é destinado à cultura de células humanas e de animais. Ao final da adição de todos os componentes, esse meio foi filtrado, utilizando-se

uma membrana de porosidade 0,22 μm e, posteriormente, distribuído em 11 garrafas de vidro estéreis, contendo cada uma 90,0 mL de DMEM, sendo que, antes da sua utilização, o meio de cultura foi enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco). Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo.

3.9.2. Métodos envolvendo células neoplásicas

a) Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas

As matrizes de células J774-A1 ($0,5 \cdot 10^6$ células mL^{-1}) estocadas em nitrogênio líquido são descongeladas a 37°C e transferidas para frascos de 75,0 mL contendo 10,0 mL de meio completo e deixadas na incubadora por 24 horas. Após este período faz-se a troca do meio, deixando que as células atinjam a confluência completa. Posteriormente, as células J774-A1 são lavadas com o tampão de Hank's e desprendidas da garrafa de cultura com o auxílio de um rodilho. A cada frasco de células é adicionado um volume complementar de 18,0 mL de meio de cultura completo sendo o volume total replicado para dois novos frascos. Este procedimento permite a definição de uma matriz primária de J774-A1.

A partir da matriz primária realiza-se a primeira replicagem de células. As células são desprendidas da garrafa de cultura seguindo o protocolo descrito acima. Após esta etapa, o meio contendo as células é transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 25°C com rotação constante de 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante é descartado, o pellet é resuspenso com 10,0 mL de meio completo e as células são distribuídas em duas placas de cultura.

A troca de meio destas células é realizada sempre que necessário. Quando o número médio de células atinge $1,5 \cdot 10^6$ células mL^{-1} prepara-se uma nova subcultura de células ($0,5 \cdot 10^6$ células mL^{-1}) ou as mesmas são congeladas.

b) Determinação da atividade celular (MTT)

O método empregado para avaliar a atividade celular faz uso do corante [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil tetrazolium] ou MTT. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

O método do MTT é simples, confiável e reprodutível. Soluções de MTT dissolvidas em meio de cultura ou em soluções salinas e na ausência de indicador vermelho de fenol são de cor amarela. A desidrogenase mitocondrial das células viáveis atuam sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa (Figura 25).

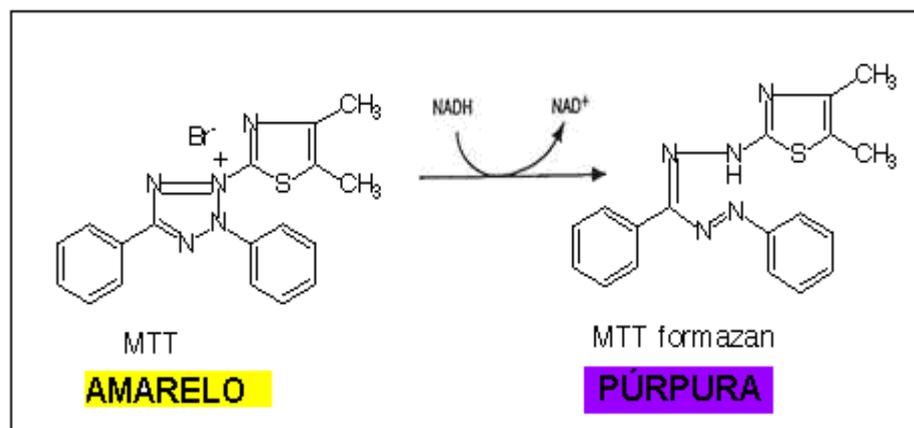


Figura 25: Metabolização do MTT para a formação do sal formazan pelas células viáveis.

Os cristais são, então, dissolvidos em isopropanol e o produto obtido é monitorado espectrofotometricamente. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado,

indicando assim o grau de citotoxicidade.^{111,112} O método do MTT de monitoramento da citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, devem ser empregadas às células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder $1,0 \cdot 10^6$ células mL⁻¹. Cada teste deve incluir um branco contendo meio completo sem nenhum fármaco.

Inicialmente, as células são removidas da incubadora, sendo levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos (24 poços). Nestas células é adicionada uma solução de MTT $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e a cultura é conduzida à incubadora por 4 horas. Após o período de incubação, as células são removidas da estufa de CO₂ e os cristais de formazan resultantes são dissolvidos pela adição de isopropanol.

O teste é finalizado através de medidas espectrofotométricas da absorbância no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo em 690 nm.¹¹³ Estas medidas são obtidas por um sistema de leitura de microplacas (ELISA) da Molecular Device modelo Versa Max.

c) Estudos de Citotoxicidade

Uma suspensão de $0,5 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ da linhagem J774-A1 foi preparada a partir da resuspensão das células das garrafas de cultura em DMEM para o experimento de citotoxicidade.

As células foram plaqueadas em placas de poços múltiplos (24 poços) e cultivadas até atingirem a confluência. Em seguida as células foram incubadas com as amostras estudadas em meio de cultura DMEM com 3% de soro fetal bovino, pelo período de três horas.

Após este período, as células foram lavadas com 1,0 mL de tampão Hank's, adicionou 1,0 mL de meio de cultura completo DMEM. Depois de 24 horas o meio foi retirado e a citotoxicidade foi avaliada através do teste do MTT, conforme descrito anteriormente (seção 3.9.2.b).

As suspensões de nanoesferas de quitosana contendo TMPyP foram testadas nas concentrações do fotossensibilizador de 1,0, 3,0 e 5,0.10⁻⁶ mol L⁻¹, a fim de se avaliar o efeito concentração-dependente sobre as células J774-A1, determinando-se desta forma qual a concentração não-citotóxica no ambiente celular. Os controles para este experimento foram: somente células (controle interno) e células com nanoesferas de quitosana vazias (sem fotossensibilizador).

A Figura 26 foi elaborada para uma melhor compreensão da montagem do experimento.

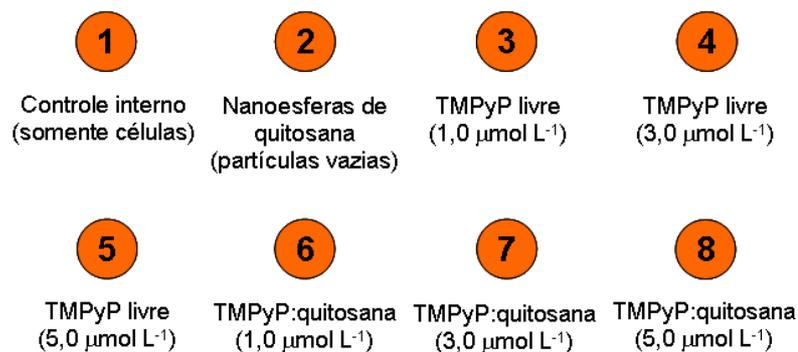


Figura 26: Representação ilustrativa do experimento de citotoxicidade.

d) Estudos de fotocitotoxicidade

Para os experimentos de fotocitotoxicidade, a cultura celular foi preparada seguindo o mesmo protocolo definido para os experimentos de citotoxicidade. A concentração não-citotóxica definida naquele experimento foi utilizada para se avaliar o efeito dose-dependente sobre as células.

Após o período de incubação com as nanoesferas na concentração não-citotóxica do fotossensibilizador ($1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), as células sofreram o tratamento com luz pela irradiação com um laser de luz vermelha, no comprimento de onda de 650 nm, que corresponde ao comprimento de onda no qual a luz é capaz de penetrar nos tecidos, levando ao efeito fotodinâmico esperado. O laser de diodo utilizado foi o sistema *Eagle* da Quantum Tech, no qual estava acoplado uma fibra óptica operando no máximo de 300 mW de potência. Os controles (células não irradiadas) para este o experimento foram células tratadas com o fotossensibilizador na concentração não-citotóxica na ausência de irradiação e células sem o tratamento com o fotossensibilizador. Além destes, células sem tratamento com fotossensibilizador foram irradiadas e utilizadas como controle.

A Figura 27 foi elaborada para uma melhor compreensão da montagem do experimento.

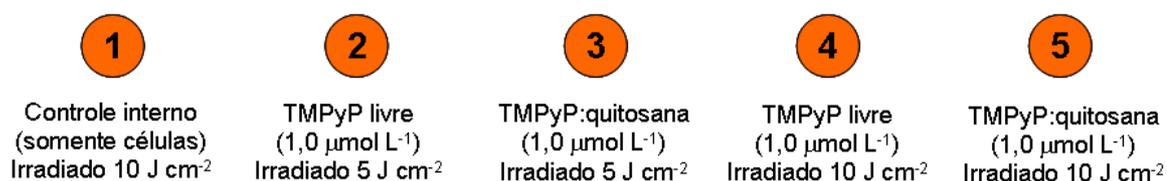


Figura 27: Representação ilustrativa do experimento de fotocitotoxicidade.

As placas de poços múltiplos utilizadas tinham 1,0 cm de diâmetro que foram irradiados com doses de 5 J cm^{-2} (28 segundos) e com dose de 10 J cm^{-2} (56 segundos).

3.10. Estudo da interação entre a TMPyP e monocamadas lipídicas mediada por quitosana como agente bioadesivo

Um estudo complementar para verificar a aplicabilidade da quitosana como veículo carregador foi realizado utilizando-se monocamadas lipídicas como sistemas biomiméticos da membrana celular para avaliar a penetração da TMPyP, mediada ou não por quitosana, na membrana (Figura 28).

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a Maria Elisabete Darbello Zaniquelli e consistiu no estudo da interação de TMPyP com monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Blodgett (LB) do lipídio dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), Figura 28, mediada por quitosana.

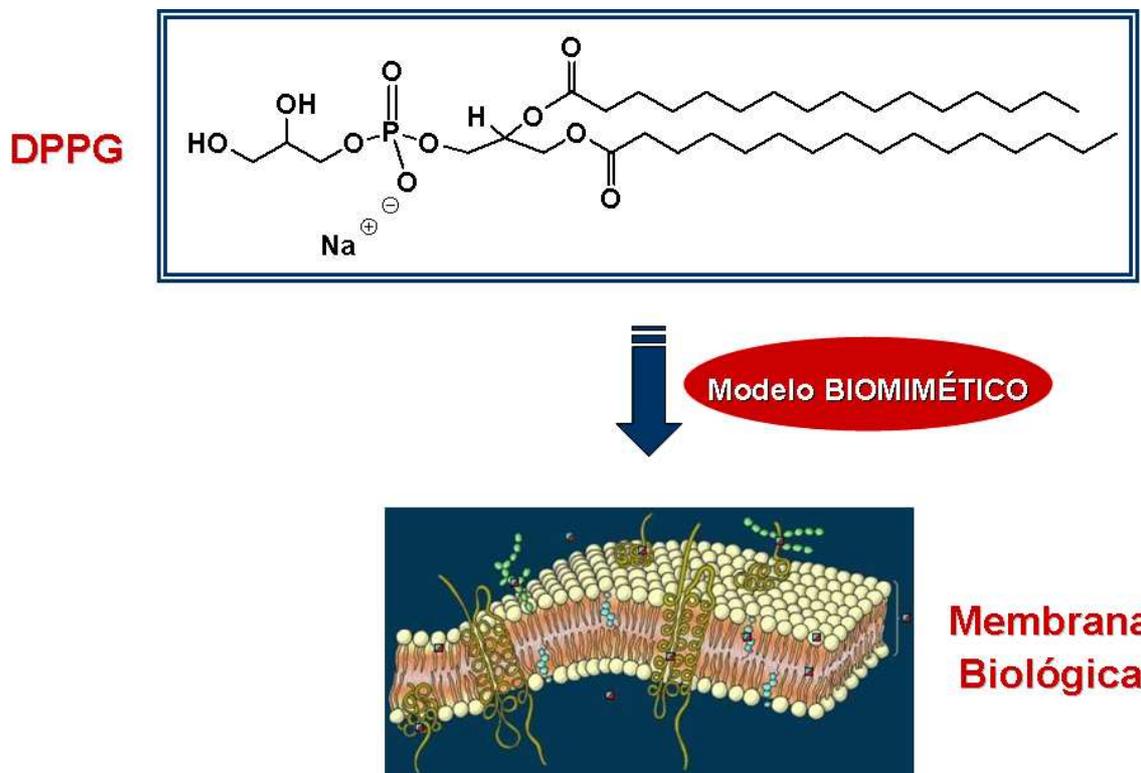


Figura 28: Estrutura molecular do DPPG, fosfolipídio utilizado como modelo de membrana biológica.¹¹⁴

3.10.1. Método da gota pendente

A interação das porfirinas com monocamadas de DPPG foi inicialmente estudada através de medidas de tensão e elasticidade superficiais empregando o método da gota pendente.

a) Tensão superficial

Uma breve explanação sobre tensão superficial faz-se necessária antes de empregarmos o método da gota pendente para a sua determinação.

Analisando as interações intermoleculares que uma molécula sofre no interior do líquido, pode-se dizer que essa molécula é atraída em todas as direções pelas outras moléculas de maneira que a resultante das forças seja praticamente nula. Entretanto, uma molécula na superfície sofre atrações para o interior do líquido, mas no sentido contrário não sofre qualquer força, ocasionando o aparecimento de forças não compensadas na superfície do líquido e fazendo com que a área da superfície seja mínima. Quando uma molécula eleva-se ligeiramente acima da superfície, as ligações moleculares entre ela e as moléculas adjacentes são tensionadas e aparece uma força restauradora que puxa a molécula para a superfície.

A tensão superficial é, portanto, definida como uma força contrativa que opera no perímetro da superfície livre para o ar e que tende a comprimi-la.

Ao espalhar uma substância tensoativa (molécula que possui uma parte apolar e outra polar) sobre um líquido de tensão superficial (γ_0) esta poderá ser reduzida a (γ). A diferença entre a tensão superficial sem a substância tensoativa e tensão superficial com a substância tensoativa fornece a pressão superficial (π):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \qquad \text{Equação 4}$$

Um dos métodos de determinação da tensão superficial é baseado no formato de uma gota pendente. O formato da gota é determinado por uma combinação de efeitos da tensão superficial e gravidade. As forças superficiais tendem a formar gotas esféricas, enquanto a gravidade tende a alongar a gota pendente.

Nesta tese a tensão superficial foi medida pelo método da gota pendente empregando o método da análise do perfil eixo-simétrica da gota (axisymmetric drop shape analysis (ADSA)) usando um tensiômetro automático (OCA-20, Dataphysics Instruments[®]).

Neste método, uma gota do líquido de interesse é formada com uma seringa, acoplada a uma bomba de injeção, na extremidade de uma agulha com ponta reta e diâmetro conhecido, que está contida dentro de uma cubeta óptica de vidro. Dentro da cubeta há certo volume do líquido trabalhado no fundo, de forma a manter a atmosfera saturada e evitar a evaporação da gota durante as medidas.



Figura 29: Tensiômetro de gota pendente.

A gota pode ser filmada através de uma câmera de aquisição rápida de imagens. Um programa com um processo de disparo programado de filmagem e que usa um posicionamento apropriado de uma linha de referência, permite registrar imagens mesmo antes da formação completa da gota. O tempo zero é definido com a formação da interface (gota) após analisar o filme e selecionando-o quadro a quadro.

A tensão superficial foi determinada digitalizando a imagem e analisando o perfil da gota e ajustando-o na equação de Young–Laplace, utilizada para condições de equilíbrio para dois fluidos homogêneos separados por uma interface:

$$\Delta P = (\rho_1 - \rho_a) gh = (\gamma/R_1) + (\gamma/R_2) \quad \text{Equação 5}$$

para a qual ΔP corresponde à diferença de pressão entre o interior e a parte externa da gota, $\rho_1 - \rho_a$ são as densidades da fase líquida e do ar, respectivamente, g é a aceleração da gravidade, h é a altura da coluna líquida na gota e R_1 e R_2 os dois raios principais de curvatura. Esses raios são expressos em termos de coordenadas no ajuste do perfil da gota à equação.

Para a realização deste experimento, uma solução de DPPG $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi gentilmente tocada numa gota com tamanho reduzido, que foi formada com uma solução aquosa de TMPyP $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 30). A gota foi expandida até obter uma pressão superficial de aproximadamente 30 mN m^{-1} , valor médio correspondente àquele de biomembranas.¹¹⁵ A cinética de adsorção da TMPyP à monocamada de DPPG foi realizada até a tensão superficial do sistema atingir um valor constante.

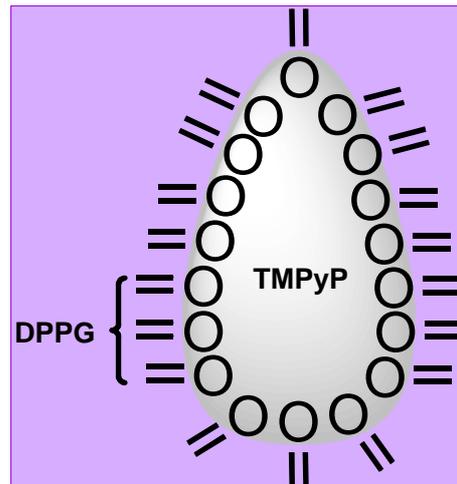


Figura 30: Representação ilustrativa da gota formada.

b) Elasticidade dilatacional superficial

Para as medidas de elasticidade superficial foi utilizado o mesmo equipamento, mas com um sistema adicional de oscilação de frequência e um programa adequado para a aquisição dos dados.

A oscilação na gota é iniciada após o sistema atingir o equilíbrio, designado pela não variação da tensão superficial em função do tempo.

Um dispositivo piezométrico localizado acima da agulha produz um movimento senoidal na gota, em valores específicos de frequência e amplitude pré-determinados. As imagens de oscilação da gota também são registradas com uma vídeo-câmera. Ao final do experimento, o programa recupera as imagens e calcula os valores de área e o valor de tensão superficial correspondente, para cada ciclo de oscilação aplicado. Assim, a elasticidade superficial dinâmica, que está relacionada com a capacidade de um sistema estabelecer um novo valor de tensão superficial após uma mudança na área, é obtida e este valor de equilíbrio (E) é definido de acordo com Gibbs:

$$E = d\gamma / d\ln A \quad \text{Equação 6}$$

Nesta equação, $d\gamma$ representa a variação infinitesimal de tensão superficial em função de uma variação da área relativa (A).

Para estas medidas uma deformação com amplitude de 0,1 mm e frequência 1,0 Hz foi usada.

3.10.2. Monocamadas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett

a) Adsorção, orientação em interface e monocamadas de Langmuir.

As moléculas anfifílicas podem se orientar na interface ar-água, uma vez que as cadeias dos hidrocarbonetos são hidrofóbicas e as cabeças polares são hidrofílicas. Estas moléculas expõem as partes polares para a fase aquosa e posicionam a parte apolar em contato com o ar, orientando-se desta forma na interface por ser a situação energeticamente mais favorável do que a dissolução completa em qualquer uma das duas fases (Figura 31).¹¹⁶

Molécula anfifílica

— Cauda apolar
● Cabeça polar

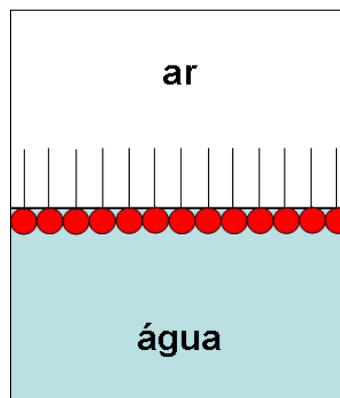


Figura 31: Adsorção de moléculas anfifílicas formando uma monocamada orientada na interface ar-água.

A formação de uma camada adsorvida numa superfície não é um processo instantâneo, mas é governada pela velocidade de difusão da substância tensoativa (molécula que possui uma parte polar e outra apolar) através da solução, em direção à interface. Podem decorrer vários segundos até que uma solução de uma substância tensoativa atinja sua tensão superficial de equilíbrio, especialmente se a solução for diluída e se as moléculas de soluto forem grandes e assimétricas.¹¹⁶

Uma vez que uma dada substância anfílica espalhe sobre uma interface líquida, as moléculas podem ser convenientemente orientadas por compressão mecânica formando uma camada monomolecular, denominada monocamada de Langmuir.

A balança de superfície ou cuba de Langmuir é um sistema desenvolvido por Langmuir que permite a preparação de monocamadas líquidas e a realização de medidas de pressão superficial, bem como a transferência de monocamadas orgânicas para substratos sólidos.¹¹⁷

A cuba de Langmuir (Figura 32) consiste em um compartimento retangular revestido internamente de um material hidrofóbico, como o teflon (poli(tetrafluoroetileno)), que contém uma barreira móvel e é preenchido com água ou solução aquosa, sobre a qual espalha-se a substância tensoativa em concentrações de $1,0 \cdot 10^{-4}$ a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ dissolvida em solvente orgânico volátil. A barreira móvel é capaz de varrer a superfície e comprimir as moléculas formando um filme de espessura monomolecular. Conforme a monocamada vai sendo comprimida, a pressão superficial vai sendo modificada.

As medidas de tensão superficial são realizadas com um dispositivo de placa de Wilhelmy suspenso a uma microbalança acoplada a um microcomputador. O princípio da medida está relacionado com a identificação da força agindo por

unidade de perímetro da placa quando a mesma é colocada em contato com a interface líquida, como a tensão superficial.

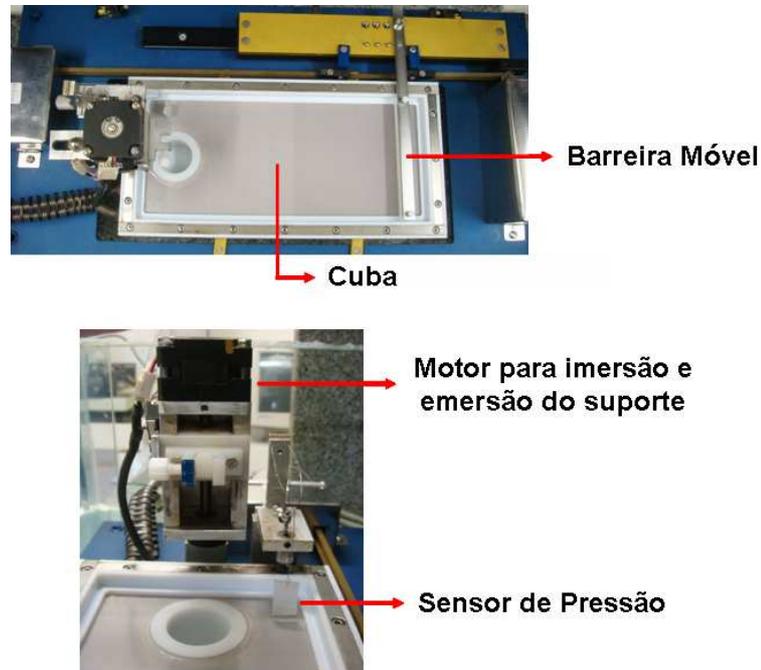


Figura 32: Esquema da cuba de Langmuir e acessórios utilizados na fabricação de monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir- Blodgett.

b) Filmes de Langmuir-Blodgett

Monocamadas líquidas podem ser transferidas para substratos sólidos através da técnica de deposição vertical, em que o substrato é imerso e suspenso através da monocamada comprimida. Esta técnica foi introduzida por Katharine Blodgett e corresponde a técnica descrita nesta tese.^{118,119}

No início do experimento, ou seja, antes das transferências, a barreira móvel é fixada em um determinado valor de pressão superficial. Assim, a monocamada é comprimida pela barreira até atingir um elevado grau de compactação. Quando este é atingido, um suporte sólido é imerso/emerso verticalmente na subfase aquosa e ao passar pela interface ar-água uma camada do filme é transferida para o substrato. Com a deposição da monocamada ocorrerá um decréscimo da pressão superficial

em função da quantidade de material retirado da interface. Desta forma, a barreira móvel deve ser acionada de modo a comprimir a monocamada para restaurar o valor de pressão superficial estabelecido inicialmente.

O número de camadas do filme será controlado pelo número de imersões e emersões deste substrato através da interface. A emersão do substrato provoca a transferência da monocamada pela parte polar e a imersão pela parte apolar (Figura 33). Dependendo do tipo de transferência, obtêm-se três tipos de deposição: X, Y e Z, conforme ilustrado na Figura 34.

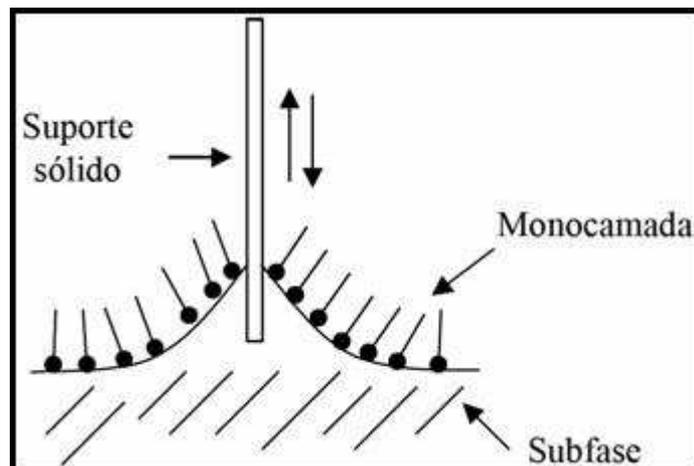


Figura 33: Representação da transferência da monocamada para o substrato.

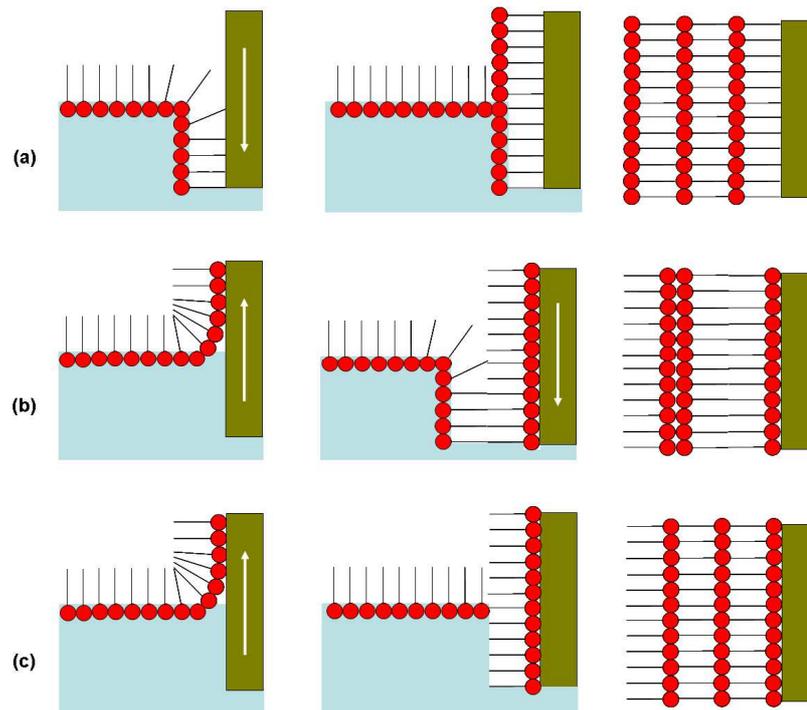


Figura 34: Método de Langmuir-Blodgett para a fabricação de filmes: (a) filme tipo X, (b) filme tipo Y e (c) filme tipo Z.

Um tipo de substrato que pode ser utilizado na preparação de filmes LB são cristais de quartzo recobertos com filmes metálicos (ouro) em ambas as faces e que atuam como eletrodos (Figura 35).

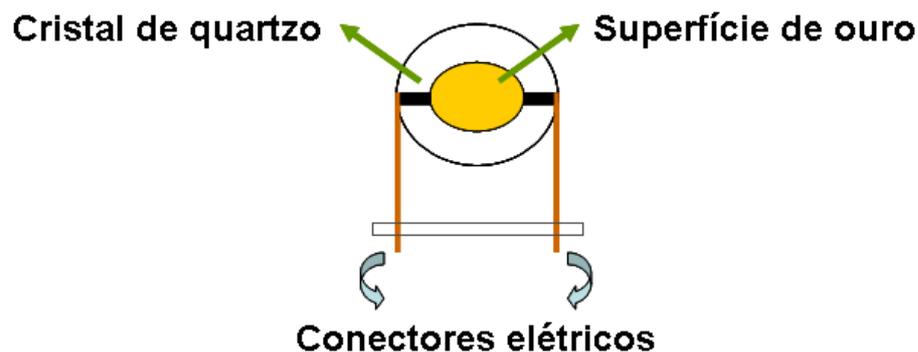


Figura 35: Esquema de um cristal de quartzo recoberto com ouro.

Nesta tese, para investigar o efeito da quitosana na interação entre TMPyP e a monocamada lipídica de DPPG, filmes LB do tipo Y foram formados seguindo a metodologia de transferência de filmes assimétricos. Foram preparados dois filmes:

a) DMPA + DPPG + TMPyP

b) DMPA + DPPG + Quitosana + TMPyP

Inicialmente, filmes LB de ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA - Figura 36) foram preparados através da transferência de três monocamadas do lipídio formadas através do espalhamento da solução lipídica ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), preparada em clorofórmio e metanol na proporção 3:1, sob uma solução de acetato de zinco ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) utilizada como subfase. O DMPA em subfase de íons Zn^{2+} apresenta uma razão de transferência de 0,98, garantindo uma matriz com elevado empacotamento e homogeneidade. Durante a deposição das monocamadas, a velocidade de transferência foi $0,038 \text{ mm s}^{-1}$ e a pressão superficial foi mantida em, aproximadamente, 30 mN m^{-1} (Figura 37).

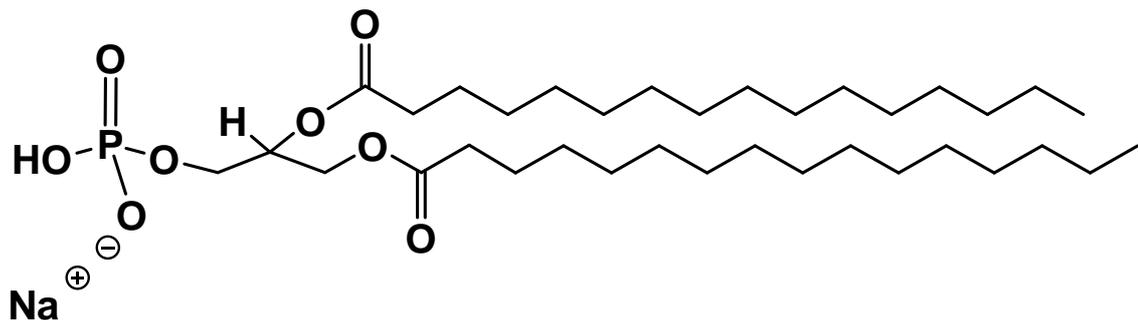


Figura 36: Estrutura molecular do DMPA.

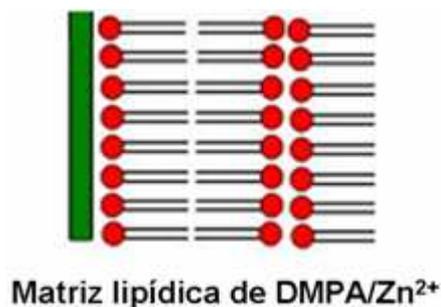


Figura 37: Filme LB de DMPA.

Posteriormente, o lipídio de interesse, DPPG, foi aderido ao filme LB como quarta camada, de modo a ser transferido ao filme por suas interações cauda-cauda

com o DMPA. A monocamada de DPPG foi formada na cuba através do espalhamento da solução lipídica ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), preparada em clorofórmio e metanol na proporção 3:1, sob água ultrapurificada (Milli Q da Millipore®) utilizada como subfase (Figura 38). A velocidade transferência foi $0,038 \text{ mm s}^{-1}$ e a pressão superficial foi mantida em, aproximadamente, 30 mN m^{-1} .

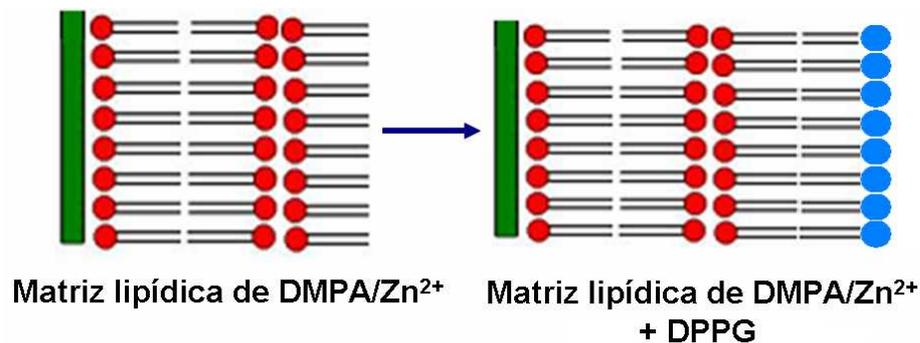


Figura 38: Filme LB de DMPA + DPPG.

Para os filmes contendo quitosana, a monocamada de DPPG foi formada através do espalhamento de uma solução ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) sob uma solução de quitosana (concentração $0,05\% \text{ m/m}$, $\text{pH} = 4,0$), utilizada como subfase. A transferência do polissacarídeo ocorreu juntamente a partir da monocamada de DPPG (Figura 39). A velocidade transferência foi $0,038 \text{ mm s}^{-1}$ e a pressão superficial foi mantida em, aproximadamente, 30 mN m^{-1} .

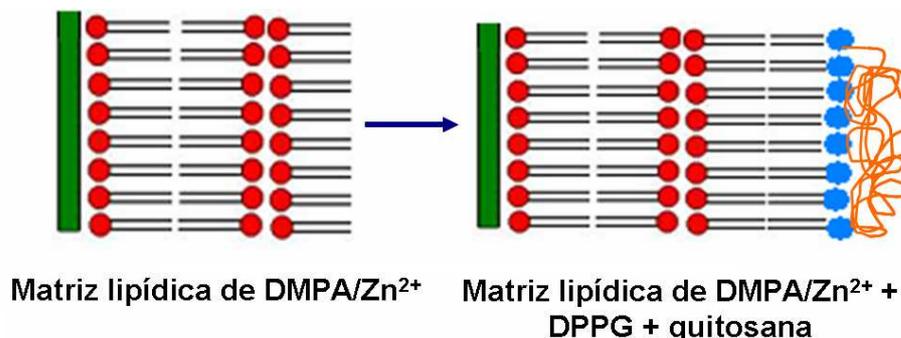


Figura 39: Filme LB de DMPA + DPPG + quitosana.

A cinética de adsorção da TMPyP aos filmes com e sem quitosana foi realizada através da técnica de imersão (dip coating). Para isto os filmes foram imersos numa solução aquosa de TMPyP ($5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) e após cada deposição os filmes foram lavados, imergindo-os em água Milli Q, para retirar o excesso de solução de porfirina (Figura 40).

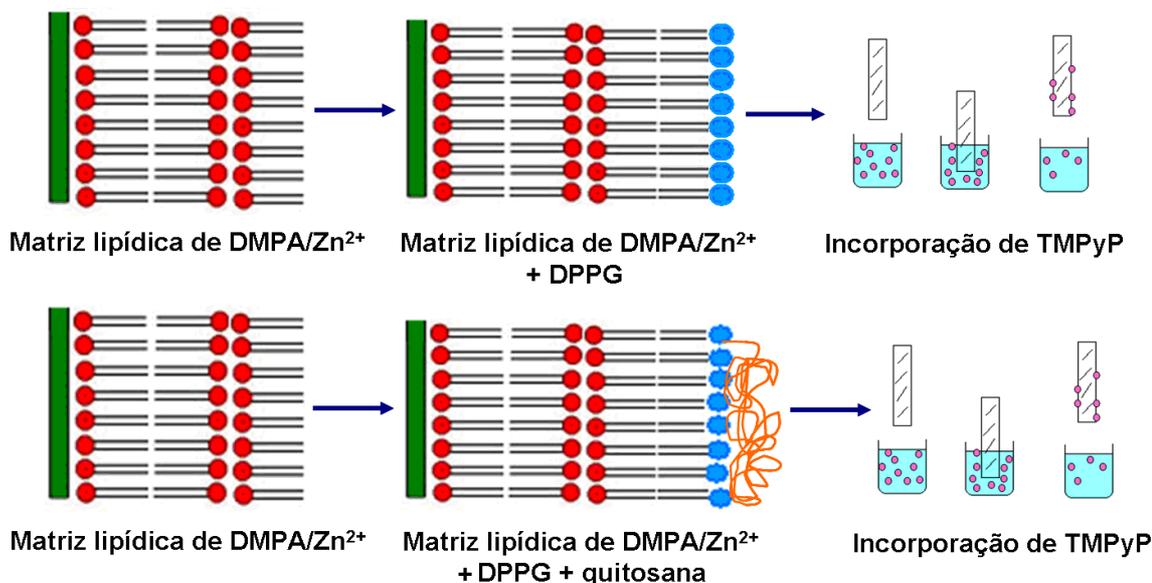


Figura 40: Formação dos filmes LB de DMPA + DPPG e DMPA + DPPG + quitosana e incorporação de TMPyP os filmes.

A quantificação da massa de TMPyP adsorvida foi determinada através da técnica microgravimétrica da Microbalança a cristal de quartzo (QCM), uma vez que os suportes sólidos aos quais os filmes foram transferidos consistiam de cristais de quartzo recobertos com uma superfície de ouro, conforme mostrado na Figura 35. Dessa forma, a quantificação se deu pela variação de frequência do material piezelétrico.

As deposições de porfirina foram interrompidas quando o valor da massa incorporada ficou constante (no caso do filme contendo quitosana) ou quando a TMPyP começou a desorver (no caso do filme sem quitosana). Além da diminuição no valor da massa calculada, esta desorção também foi observada através dos

espectros de emissão dos filmes, que foram realizados acompanhando a cinética de adsorção da porfirina. O número de imersões dos filmes na solução de TMPyP e os respectivos tempos de imersão e de lavagem encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Valores obtidos na cinética de deposição da TMPyP aos filmes LB.

Filme LB	Nº de imersões na solução de TMPyP	Tempo de imersão (min)	Tempo de lavagem (s)
DMPA + DPPG	3	0,5	5
	1	2	20
DMPA + DPPG + quitosana	4	0,5	5
	4	1	10
	1	2	20
	1	4	40
	1	8	80

3.11. Caracterização das amostras

3.11.1. Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica das partículas foi efetuada no Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss Evo[®] – 50, existente no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

Em todos os casos, aproximadamente 2,0 mg das amostras sólidas foram adicionadas em 1,0 mL de clorofórmio e suspensas com o auxílio de banho de ultrassom. Duas gotas de cada suspensão foram colocadas sobre as lamínulas de vidro aderidas aos suportes de análise. Após secarem, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro (SCD 050 Sputter Coater, BAL Tec[®]).

3.11.2. Microscopia eletrônica de transmissão

A caracterização das partículas foi efetuada no Microscópio de Transmissão Philips CM200, equipado com um Espectrômetro Digital – Prism PGT- Princeton Gamma Tech, existente no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da UNESP - Araraquara.

Em todos os casos, aproximadamente 2,0 mg das amostras sólidas foram adicionadas em 1,0 mL de tetracloreto de carbono e suspensas com o auxílio de banho de ultra-som e suportadas numa grade de cobre.

3.11.3. Análises térmicas

As análises de TGA e DTA foram realizadas em aparelhos da Shimadzu dos seguintes modelos: TGA 50 e DTA 50. Estes aparelhos pertencem a Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Para a realização das análises de TGA e DTA foram fixados os seguintes parâmetros:

- taxa de aquecimento: $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$,
- faixa de aquecimento: 25 a 800°C ,
- atmosfera de nitrogênio.

3.11.4. Difração de raio-x

a) Amostras de dextrina

A difração de raio-x foi realizada no difratômetro de raios-X Siemens® D5000, radiação $K\alpha$ Cu, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, monocromador de grafite, com 2θ variando de 4 a 70° , incremento de $0,02^\circ$ e tempo de integração de 1 s, existente no Instituto de Química da UNESP – Araraquara.

b) Amostras de quitosana, TMPyP e de TMPyP encapsulada em quitosana

A difração de raio-x foi realizada no difratômetro de raio-X Siemens® D5005, radiação $K\alpha$ Cu, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, monocromador de grafite, com 2θ variando de 2 a 60° , incremento de $0,02^\circ$ e tempo de integração de 1 s, existente no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

Para a realização das análises foram utilizados suportes preparados pelo grupo, que consistem de uma lâmina de vidro com uma depressão no centro. As amostras de dextrina, de quitosana, TMPyP e de TMPyP encapsulada em quitosana foram colocadas e compactadas nesta depressão existente na lâmina.

3.11.5. Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível

As caracterizações por espectroscopia UV-vis foram efetuadas no Espectrofotômetro HP 8453 Diode Array, existente no Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

3.11.6. Espectroscopia eletrônica de fotoluminescência

A caracterização por espectroscopia eletrônica de fotoluminescência foi feita no Espectrofluorímetro - SPEX TRIAX FLUOROLOG 3 – existente no Laboratório de Terras Raras do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

3.11.7. Ressonância magnética nuclear de próton

A análise de ^1H -RMN da quitosana foi realizada no espectrômetro Bruker (DRX 500), existente no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. As análises foram feitas utilizando-se água deuterada (D_2O) acidificada como solvente.

3.11.8. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Bomem[®] MB 102, existente no Laboratório de Fotoquímica Inorgânica do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Para a confecção das pastilhas e realização das análises, as amostras foram misturadas com KBr seco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de um spray dryer

No item 3.1 foram relatados 13 experimentos, realizados com o objetivo de projetar e desenvolver um *spray dryer* de baixo custo e efetivo para a encapsulação de porfirinas em nanoesferas poliméricas.

No 12º experimento a configuração projetada estava próxima da final e, assim, a dextrina recuperada foi caracterizada por MEV.

4.1.1. Microscopia eletrônica de varredura: 12º Experimento

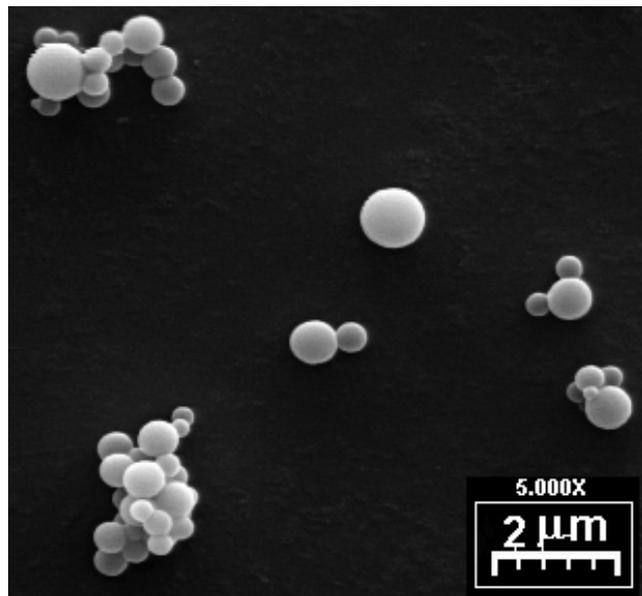


Figura 41: Imagem de MEV das nanoesferas produzidas no 12º experimento.

Como pode ser visto na Figura 41, a configuração elaborada na 12ª tentativa resultou na formação de partículas de dextrina com morfologia esférica. Porém, a massa de polímero recuperada após o processo *spray drying* foi muito pequena, aproximadamente 2,5%.

Neste penúltimo experimento a grande melhoria em relação às tentativas anteriores foi o início da nebulização diretamente dentro do forno, sem a utilização de conectores de vidro (Figura 22). Esta alteração foi importante, pois impediu a retenção de solução nestes conectores, que poderia levar à coalescência das gotas e a formação partículas grandes. Além disso, a junta de rotaevaporador utilizada como *trap* de segurança foi importante para impedir que o vapor de água condensasse no balão coletor. Entretanto, esta peça não impediu que o pó formado fosse arrastado junto com o vapor. Desta forma, ainda era necessário melhorar o sistema de coleta e aumentar o rendimento.

Neste momento sabíamos que precisávamos desenvolver algo que evitasse a condensação no sistema coletor e que separasse as partículas do ar. Com base nestas premissas, o equipamento desenvolvido no 13^o experimento do item 3.1 e esboçado na Figura 23 contém uma membrana de celulose suportada sobre um filtro de placa sinterizada para reter as partículas e uma bomba de sucção para evitar a condensação do vapor no sistema coletor. Esta configuração permitiu a produção partículas de dextrina com satisfatória porcentagem de recuperação na membrana coletora (aproximadamente 70%).

O material seco obtido na 13^a tentativa foi analisado por MEV, MET, TGA, DTA, DRX e EDS. A dextrina de partida também foi analisada por MEV, TGA, DTA, DRX para verificar se o processo *spray drying* não afetou as propriedades do polímero.

4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura: 13º Experimento

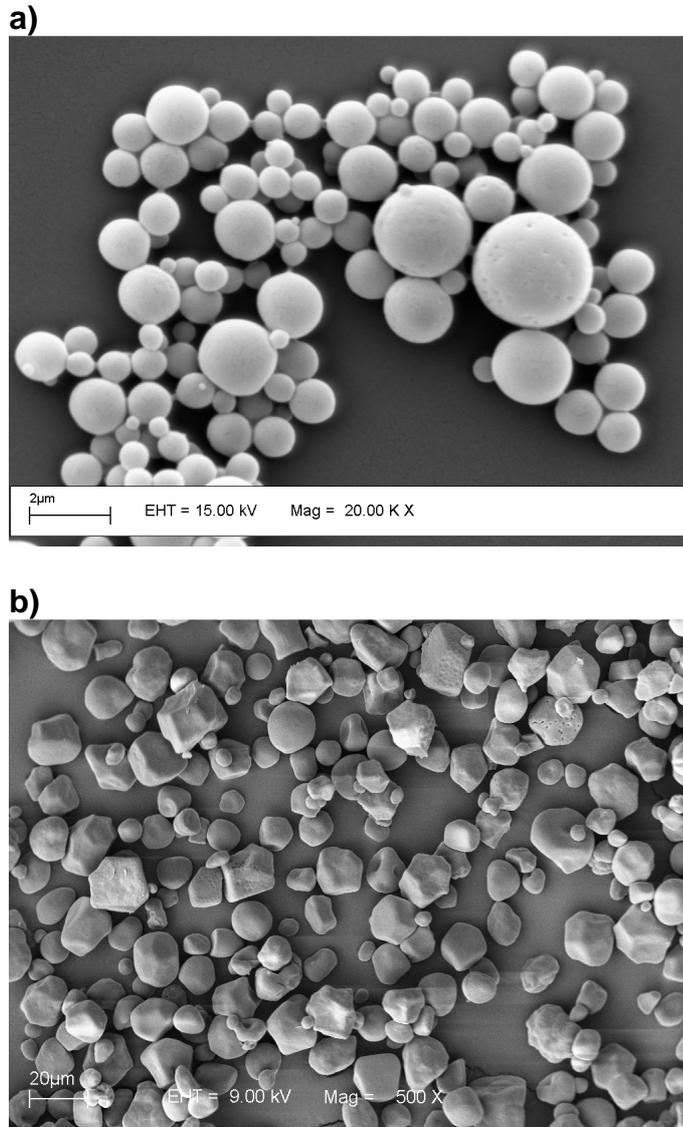


Figura 42: Imagens de MEV de a) dextrina nanoesférica obtida após o processo de *spray drying* (13º Experimento) e b) dextrina de partida.

A partir da Figura 42a é possível verificar que o *spray dryer* desenvolvido foi empregado com sucesso na produção de partículas de dextrina com morfologia esférica. A dextrina de partida (Figura 42b) não apresenta morfologia definida e as partículas são maiores (~ 10 vezes maior).

A distribuição do tamanho das esferas preparadas foi determinada a partir das imagens de MEV. Para isso, foram analisadas, utilizando-se o programa *Image J*, aproximadamente 1000 nanoesferas, e a distribuição com os respectivos valores de diâmetro médio e desvio padrão, encontra-se na Figura 43.

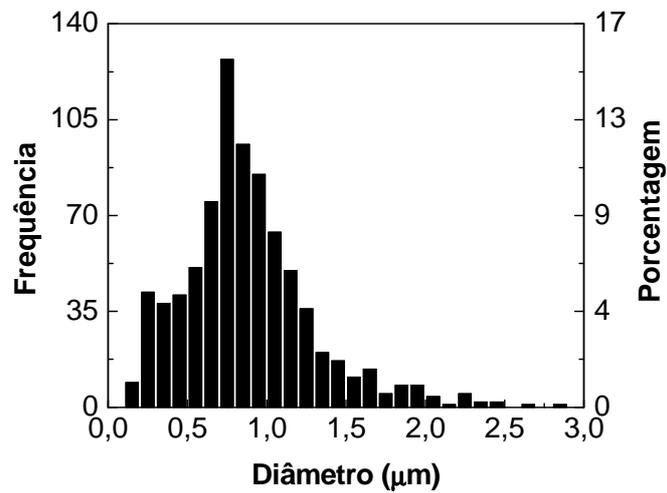


Figura 43: Distribuição dos diâmetros das partículas esféricas de dextrina.

A partir do histograma da Figura 43 foram determinados o diâmetro médio e o respectivo desvio padrão das nanoesferas de dextrina: **880 ± 410 nm**.

4.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão e Espectroscopia de energia dispersiva

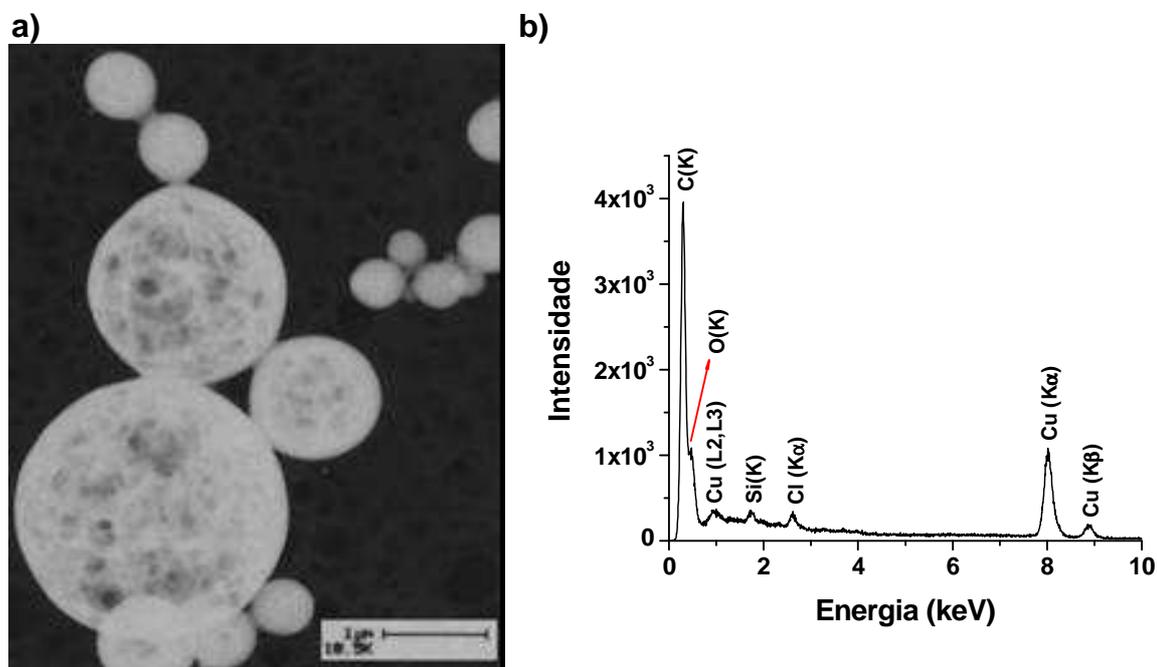


Figura 44: a) Imagem de MET das nanoesferas de dextrina e b) Espectro de EDS de uma nanoesfera de dextrina.

A imagem de MET (Figura 44a) confirma a forma esférica das partículas e fornece uma idéia do interior do material. A presença de contrastes escuros nas partículas maiores poderia levar-nos a concluir que as mesmas são altamente porosas, o que estaria em contradição com a formação preferencial de esferas pelo método *spray drying*.¹⁰⁵ Entretanto, é importante ressaltar que durante a focalização das partículas para registrar a imagem, a estrutura interna das nanoesferas sofreu alteração (expansão) em função da ação do feixe incidente. Esta expansão foi originada pela vaporização do solvente incorporado, ou seja, o tetracloreto de carbono, CCl₄, utilizado para suspender as partículas. A espectroscopia de energia dispersiva de uma partícula foi realizada durante a análise por MET (Figura 44b) e a

presença de Cl ($K\alpha$) no espectro de EDS obtido confirma a explicação para a expansão das partículas.

4.1.4. Análises térmicas

As análises térmicas por TGA e DTA foram realizadas com a finalidade verificar se as temperaturas de secagem escolhidas não alteraram as propriedades da dextrina após o processo de *spray drying*.

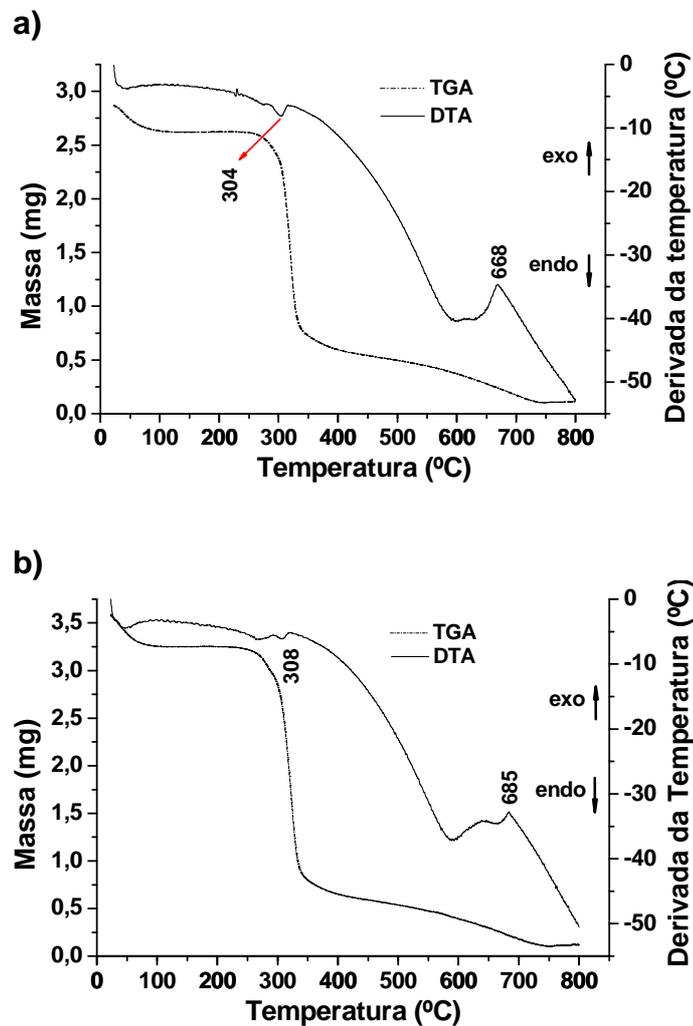


Figura 45: Análises térmicas a) dextrina de partida b) dextrina nanoesférica.

Podemos observar pelas curvas de TGA (Figura 45a, b) que há uma etapa de desidratação até aproximadamente 100°C, caracterizada por uma diminuição na massa. Após a desidratação, é possível observar uma etapa de degradação endotérmica da dextrina, representada por uma perda de massa “abrupta” de, aproximadamente, 300 a 350 °C. Esta é seguida por uma perda contínua que se estende até o final do experimento (750°C).¹²⁰ Após a degradação sobra um resíduo, provavelmente um “carvão”, considerando que o experimento foi realizado em atmosfera de nitrogênio.¹²¹

4.1.5. Difração de raio-x

Os difratogramas obtidos exibiram a ausência de picos de difração e a presença de um halo que se estendeu quase por todo intervalo medido, permitindo concluir que a dextrina de partida e a dextrina nanoesférica são pós não cristalinos.¹²¹

4.2. Metodologia utilizada para a determinação do diâmetro médio das partículas produzidas

Vários fatores podem afetar a morfologia das partículas produzidas por *spray drying*. Entre eles, podem ser citadas a temperatura, a concentração da solução, o fluxo do gás de arraste, o tempo de evaporação do solvente e o tempo de difusão do solvente.¹²²

Dentre estes fatores, o efeito da concentração da solução polimérica foi estudado. Segundo a literatura, era esperado que o tamanho de partícula aumentasse com a concentração da solução polimérica, uma vez que a massa de polímero por gota era maior.¹²³

Para isso, foram produzidas nanopartículas por *spray drying* das soluções de dextrina com diferentes concentrações, conforme descrito no item 3.2. A forma das partículas obtidas foi caracterizada por MEV.

4.2.1. Microscopia eletrônica de varredura

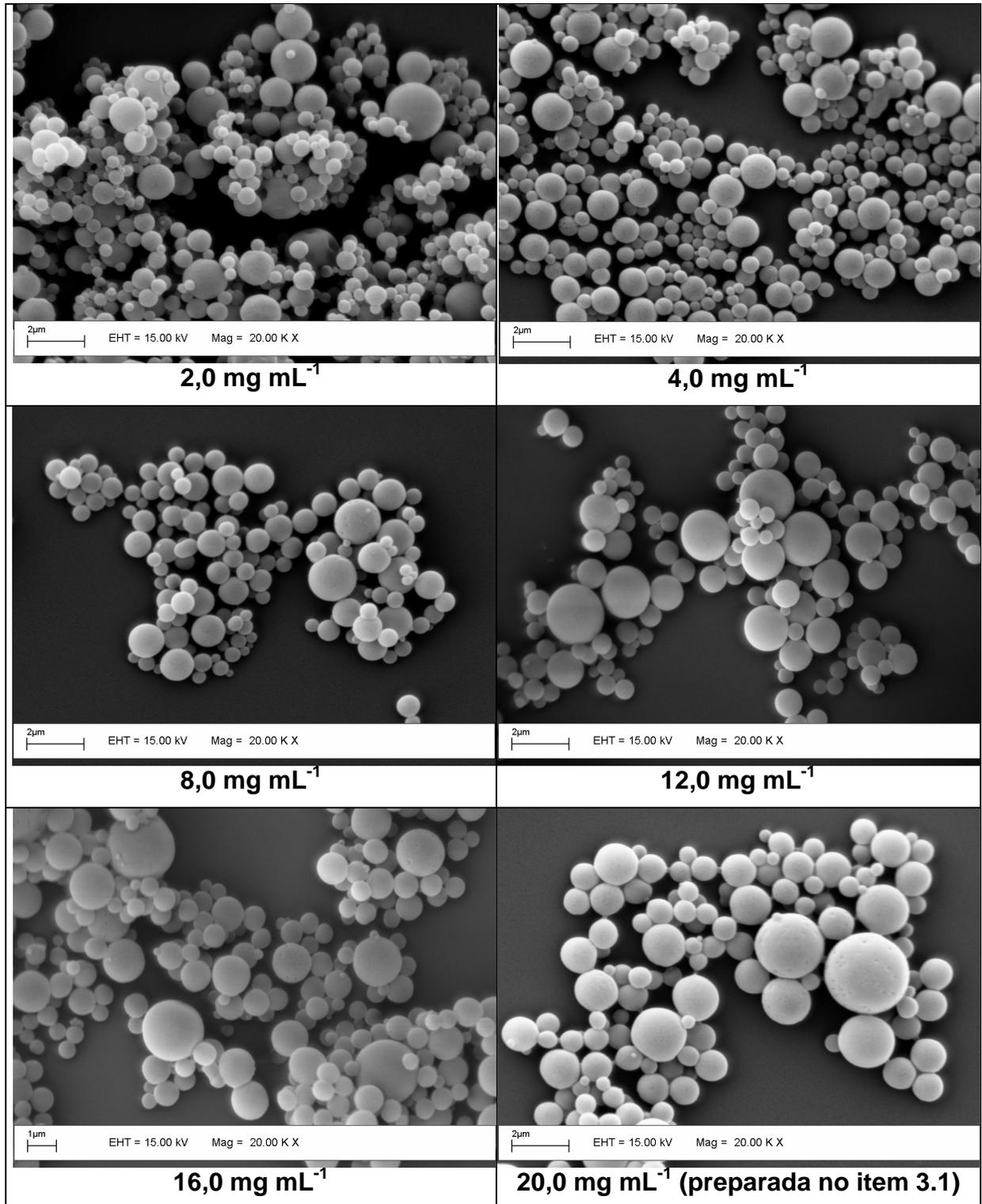


Figura 46: Imagens de MEV para avaliar o efeito da concentração no tamanho de partícula de dextrina.

Pela Figura 46 podemos observar que as partículas de dextrina apresentam morfologia esférica, confirmando a reprodutibilidade do equipamento desenvolvido pelo grupo para a produção de esferas poliméricas. A determinação do diâmetro médio das partículas preparadas foi realizada a partir da análise de, aproximadamente, 1000 partículas presentes nas imagens de MEV utilizando o programa *Image J* e por espalhamento de luz laser.

No caso da análise das micrografias de MEV, as distribuições com os respectivos valores de diâmetro médio e desvio padrão encontram-se na Figura 47.

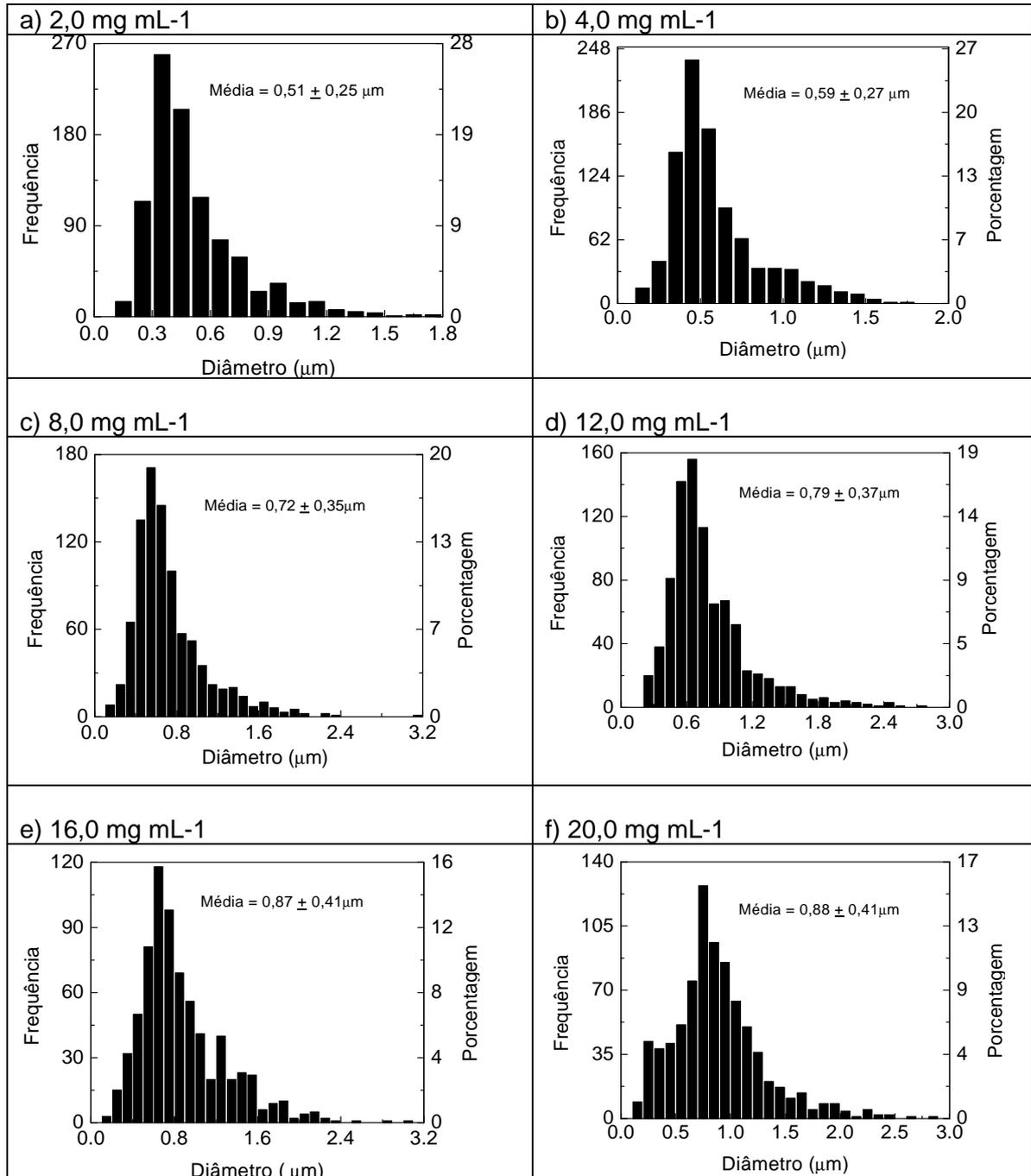


Figura 47: Distribuição do tamanho de partícula em diferentes concentrações da solução de dextrina.

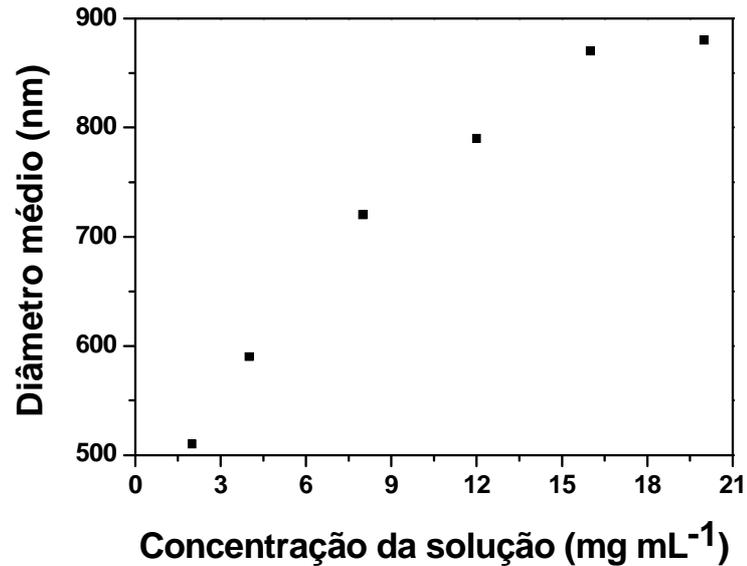


Figura 48: Variação do diâmetro médio das esferas de dextrina em função da concentração da solução polimérica.

A partir dos histogramas da Figura 47 o gráfico da Figura 48 foi construído para uma melhor visualização da influência da concentração da solução polimérica no diâmetro médio das partículas. Assim, podemos observar que o aumento da concentração da solução polimérica ocasiona um aumento do tamanho médio de partícula. Este comportamento é o esperado e pode ser explicado em função da geração de gotas contendo maior massa de polímero nas soluções mais concentradas.

4.2.2. Espalhamento de luz laser

Os diâmetros médios determinados pela técnica de espalhamento de luz laser estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de tamanho de partícula determinado por espalhamento de luz laser.

Concentração da solução de dextrina (mg mL⁻¹)	Diâmetro médio (µm)	Número de ciclos considerados em 10
2,0	3,9	4
4,0	3,5	5
8,0	3,4	5
12,0	2,7	6
16,0	2,6	6
20,0	1,7	6

Pela Tabela 2, podemos verificar um comportamento contrário e discrepante, principalmente para as soluções mais diluídas, em relação ao obtido por MEV. Por espalhamento de luz laser o diâmetro médio determinado diminuiu em função do aumento da concentração da solução polimérica. A explicação para estes resultados está baseada no fato de que as partículas menores tendem a se aglomerar mais em virtude de possuírem carga superficial maior. Desta forma o que foi determinado nas medidas por espalhamento de luz laser foi tamanho do agregado e não o diâmetro da partícula.

Com base nestes estudos comparativos, decidiu-se utilizar a análise das imagens de MEV para determinar o diâmetro médio das demais nanoesferas produzidas durante este trabalho de doutorado.

4.3. Estabelecimento de uma metodologia de encapsulação por spray drying

Conforme mencionado no item 3.3, o *spray dryer* empregado possui partes plásticas (não inertes a solventes orgânicos) e, por isso, foi necessário utilizar polímeros e porfirinas hidrossolúveis. Para verificar a aplicabilidade deste equipamento, iniciar os estudos de incorporação e estabelecer uma metodologia de encapsulação (temperatura, concentração da solução e proporção porfirina/polímero), o polímero utilizado foi a dextrina e MnTPPS₄ e TPPS₄ foram os modelos solúveis de metaloporfirina e porfirina, respectivamente.

4.3.1. Síntese e caracterização da MnTPPS₄

A reação de metalação da TPPS₄ foi realizada segundo metodologia de inserção heterogênea de metal descrita por Herrmann.¹⁰⁹ A reação de inserção de metal pode ser realizada utilizando-se óxidos metálicos, metais livres, sulfetos metálicos e outros sais metálicos insolúveis em água ou em solventes não aquosos. Porém, este método que foi empregado, tem sido usado com sucesso para preparar complexos metálicos de uma série de porfirinas, inclusive a de TPPS₄.

Segundo Herrmann, este tipo de reação metalação apresenta uma vantagem imediata sobre métodos convencionais, que é a remoção do excesso de reagente metálico do produto através de uma simples filtração. Assim, os aspectos mais convenientes da inserção heterogênea de metal nas porfirinas podem ser descritos como: simplicidade de preparação das metaloporfirinas, principalmente as solúveis em água, não é necessária a precipitação do produto final, levando a um baixo rendimento, o produto não é contaminado por contra-íons e nem por excesso de

metal, já que a fase sólida é altamente insolúvel, sendo facilmente removida por filtração.¹⁰⁹

Inicialmente, foram realizadas a síntese e purificação da MnTPPS₄. O produto foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis.

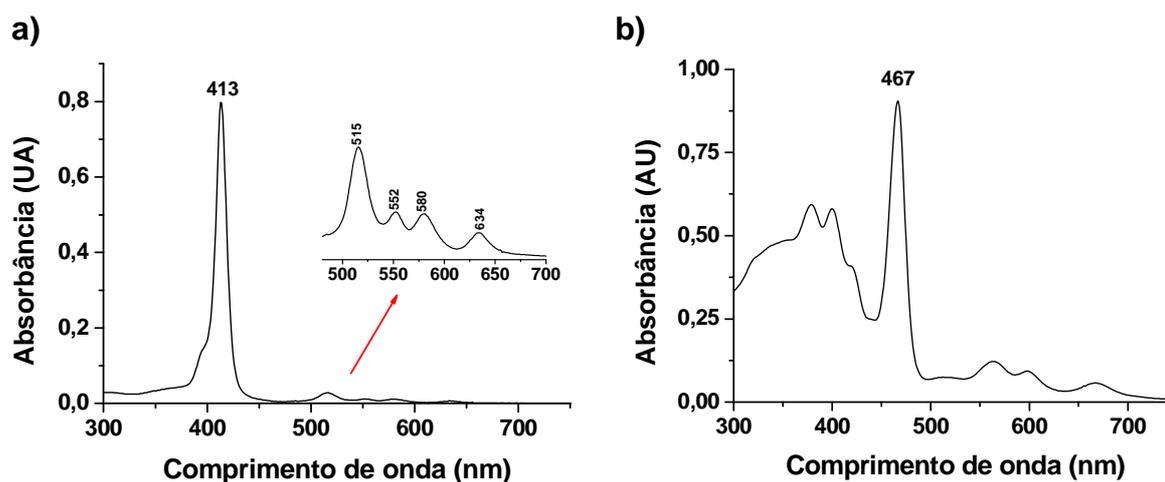


Figura 49: Espectros UV-Vis em solução aquosa de a) TPPS₄ de partida ($1,9 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) e b) MnTPPS₄ obtida.

A ocorrência da reação pode ser verificada devido ao deslocamento da banda Soret em 414 nm, característica das porfirinas (Figura 49a), para 468 nm, característica de uma Mn(III) porfirina (Figura 49b). Além disso, observamos a perda da fluorescência vermelha da TPPS₄ por CCD.

O modelo mais aceito para interpretar os espectros eletrônicos de porfirinas é o “Modelo dos Quatro Orbitais de Fronteira” (Figura 50a), proposto por Gouterman e que enfatiza transições entre os dois orbitais moleculares, quase degenerados, preenchidos de maior energia e com simetrias a_{1u} (π) e a_{2u} (π) e os orbitais moleculares desocupados e duplamente degenerados de menor energia e com simetria $e_{g,x,y}$ (π^*) (Figura 50b).^{124,125,126,127}

O espectro eletrônico das porfirinas em sua forma base livre (não metalada) apresenta, de maneira geral, cinco bandas características. A transição mais intensa,

denominada Soret, possui máximo de absorção entre 410 e 450 nm e apresenta absorvidade molar em torno de $10^5 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Esta banda é também designada B(0,0). As demais bandas apresentam máximos de absorção na região entre 500 e 700 nm e absorvidades molares muito menores do que a banda Soret. Estas bandas são, também, denominadas bandas Q e são, na ordem decrescente de energia, Qy(1,0), Qy(0,0), Qx(1,0) e Qx(0,0).

Estas cinco bandas do espectro de porfirinas base livre (grupo pontual D_{2h}) são devidas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$. As metaloporfirinas possuem maior simetria (D_{4h}) e, conseqüentemente, um menor número de transições permitidas. Assim, o espectro de metaloporfirinas apresenta, de maneira geral, a banda Soret e somente as bandas Q(1,0) e Q(0,0), na ordem decrescente de energia.

O modelo dos quatro orbitais atribuí à banda Soret a transição do orbital molecular a_{1u} para o orbital molecular desocupado de menor energia e_g . No caso das metaloporfirinas (D_{4h}) as duas bandas Q são devidas a transições do orbital a_{2u} para os níveis vibracionais 0 e 1 do orbital excitado e_g (Figura 50b).

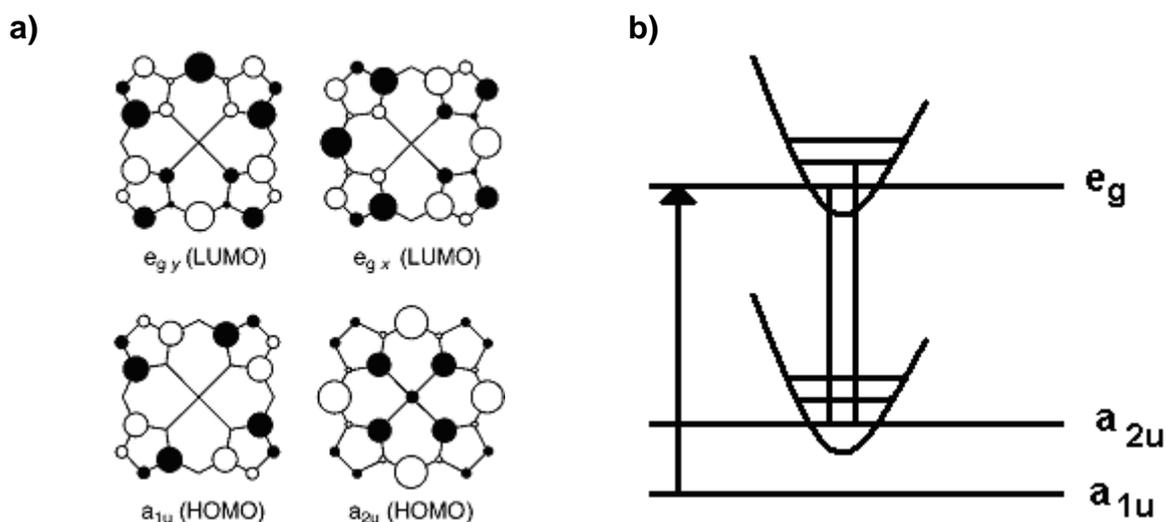


Figura 50: a) Modelo dos quatro orbitais de Gouterman e b) Diagrama de níveis de energia de orbitais π de uma metaloporfirina.

As metaloporfirinas podem ser classificadas, de acordo com seu espectro de absorção e emissão, em regulares e irregulares. As metaloporfirinas regulares (ou normais) são aquelas cujos espectros de absorção e emissão são determinados essencialmente pelos elétrons do anel porfirínico (transições $\pi \rightarrow \pi^*$), com um mínimo de perturbação dos elétrons do substituinte central. Os espectros de absorção de metaloporfirinas irregulares podem ser de dois tipos: *hypso* e *hyper*. Os espectros de absorção *hypso* são semelhantes ao normal, porém, as bandas são deslocadas para o ultravioleta. Estes espectros são característicos de porfirinas com metal de configuração d^n , $n = 6 - 9$, que possuem orbital com simetria e_g (d) ocupado. Os espectros de absorção *hyper* apresentam bandas extras relativamente intensas em comprimentos de onda acima de 320 nm.

As metaloporfirinas dos metais de transição com configuração d^n , $1 \leq n \leq 6$, com orbitais vazios e_g (d) tem espectro do tipo *hyper*. As bandas extras são atribuídas às transições de transferência de carga $a_{1u}(\pi)$, $a_{2u}(\pi)$ (anel) $\rightarrow e_g$ (d) (metal).

Observando a (Figura 49b) e baseando nesta discussão teórica, podemos concluir que o espectro obtido para a $MnTPPS_4$ está de acordo com o de uma metaloporfirina irregular do tipo *hyper*, pois podemos verificar a presença de duas bandas extras relativamente intensas em 378 e 400 nm atribuídas às transições de transferência de carga $a_{1u}(\pi)$, $a_{2u}(\pi)$ (anel) $\rightarrow e_g$ (d) (metal).

4.3.2. Encapsulação da $MnTPPS_4$

Após ser obtida, a $MnTPPS_4$ foi encapsulada em dextrina. Esta encapsulação foi realizada para que o metal de transição atuasse como sonda, indicando a

presença da metaloporfirina nas partículas. O composto obtido foi caracterizado por MEV, MET e EDS.

a) Microscopia eletrônica de varredura

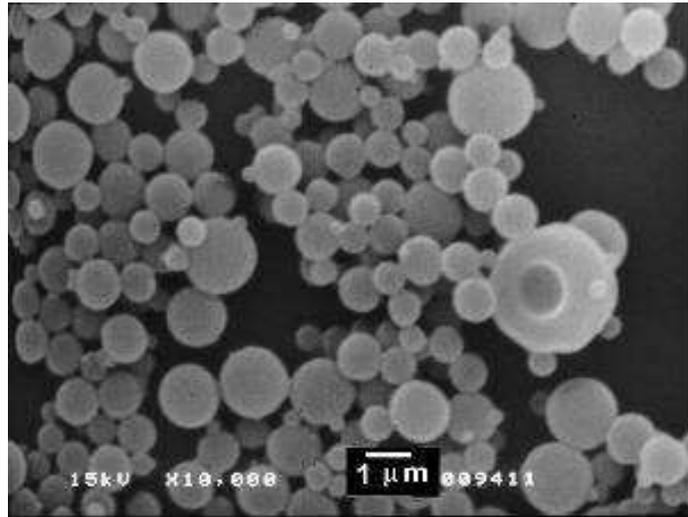


Figura 51: Imagem de MEV das esferas de dextrina contendo MnTPPS₄ veiculada.

A partir da imagem de MEV (Figura 51) pode-se observar que o composto encapsulado produzido tem morfologia esférica e o intervalo de tamanho das partículas é 0,2 - 2,6 μm.

b) Microscopia eletrônica de transmissão e Espectroscopia de energia dispersiva

O acompanhamento da morfologia também foi verificado por MET (Figura 52a), que confirmou a forma esférica das partículas.

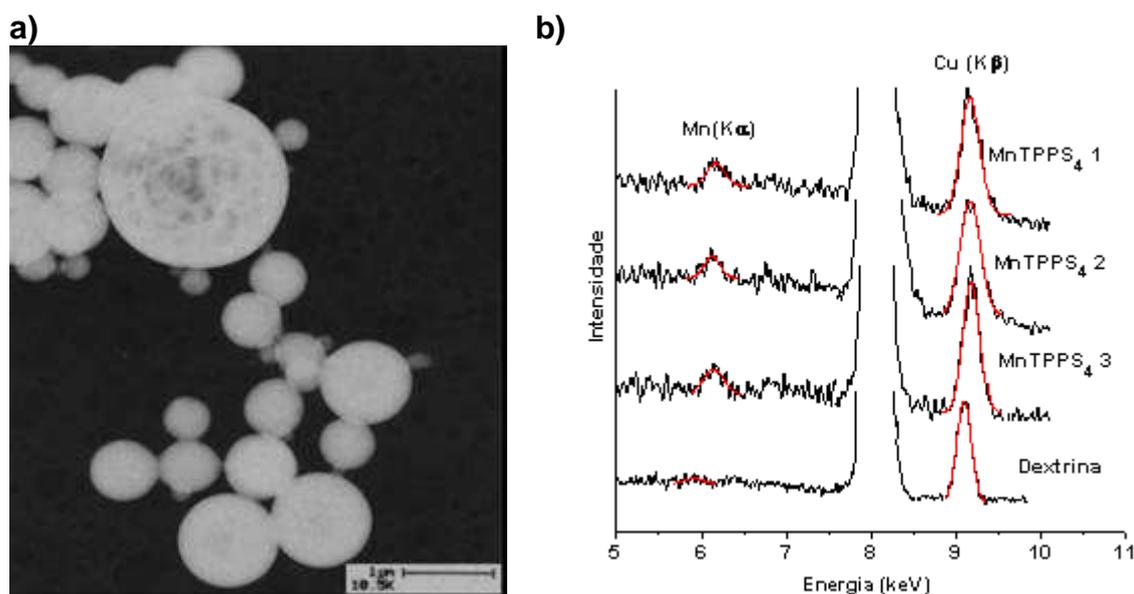


Figura 52: a) Imagem de MET das esferas de dextrina contendo MnTPPS₄ veiculada e b) EDS de esferas de dextrina contendo ou não a metaloporfirina.

A espectroscopia de energia dispersiva de uma partícula foi realizada durante a análise por MET (Figura 52b). Assim, três partículas foram focalizadas para a realização do EDS. O espectro de EDS de uma nanoesfera da dextrina é apresentado para confirmar a ausência do pico referente ao Mn (K α). Pelos espectros de EDS registrados, a presença do pico de difração referente ao Mn (K α) confirma a existência de MnTPPS₄ nas três esferas analisadas do composto encapsulado.

c) Porcentagem de MnTPPS₄ associada às nanoesferas de dextrina e eficiência de encapsulação

Após as amostras terem sido analisadas por espectroscopia UV-Vis, foi possível determinar a massa de MnTPPS₄ presente dentro e fora da nanoesferas de dextrina, utilizando-se os valores de absorbância em 468 nm e a respectiva curva de calibração. Os resultados obtidos e a da eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores obtidos de massa de MnTPPS₄ e Eficiência de Encapsulação da MnTPPS₄ em 10,0 mg de nanoesferas de dextrina. Média de 3 determinações.

	Massa (µg)
MnTPPS ₄ externa	3,3
MnTPPS ₄ interna	85,9
MnTPPS ₄ total	89,2
Eficiência de Encapsulação = 96,3%	
Eficiência de Encapsulação Teórica = 89,2%	

O sucesso de uma encapsulação é alcançado quando há uma alta retenção de material ativo durante o processo e, geralmente, as encapsulações por *spray drying* ocorrem com elevada eficiência.^{100,128} Pela Tabela 3, a alta eficiência obtida sugere que o *spray dryer* desenvolvido proporcionou encapsulações com elevada incorporação de MnTPPS₄ nas nanoesferas de dextrina, podendo ser empregado com sucesso na incorporação de porfirinas em matrizes poliméricas.

A porcentagem de MnTPPS₄ presente nas nanoesferas de dextrina, ou taxa de associação, foi determinada em **0,89%**.

4.3.3. Encapsulação da TPPS₄

Com objetivo de verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos para a MnTPPS₄, a encapsulação da respectiva porfirina base livre em dextrina foi realizada. O pó obtido foi caracterizado morfologicamente por MEV e MET.

a) Microscopia eletrônica de varredura

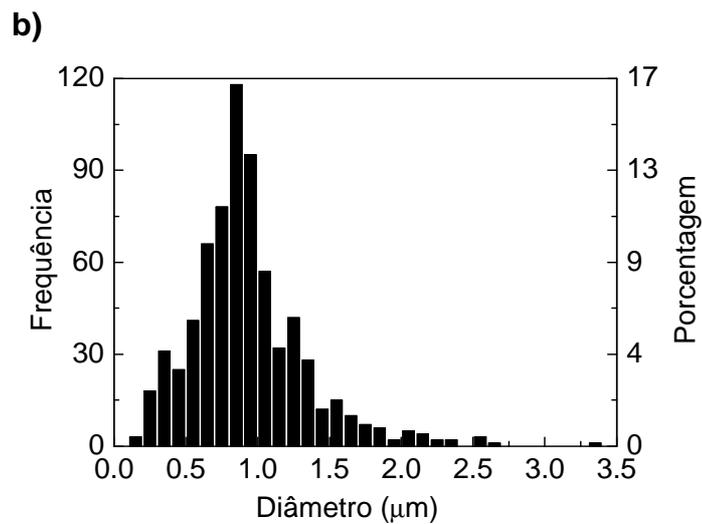
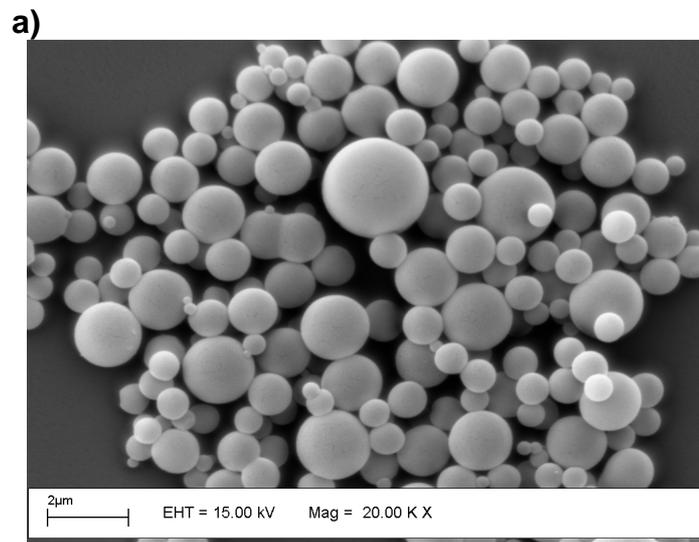


Figura 53: a) Imagem de MEV das esferas de dextrina contendo TPPS₄ veiculada e b) Distribuição do tamanho das nanoesferas obtidas.

A imagem de MEV confirmou a morfologia esférica das partículas (Figura 53a), cuja distribuição de tamanho foi determinada a partir da análise de aproximadamente 1000 nanoesferas presentes nas imagens de MEV. Pelo histograma da Figura 53b, foram determinados o diâmetro médio e o respectivo desvio padrão das nanoesferas de dextrina contendo TPPS₄ veiculada: **920 ± 410 nm**.

b) Microscopia eletrônica de transmissão

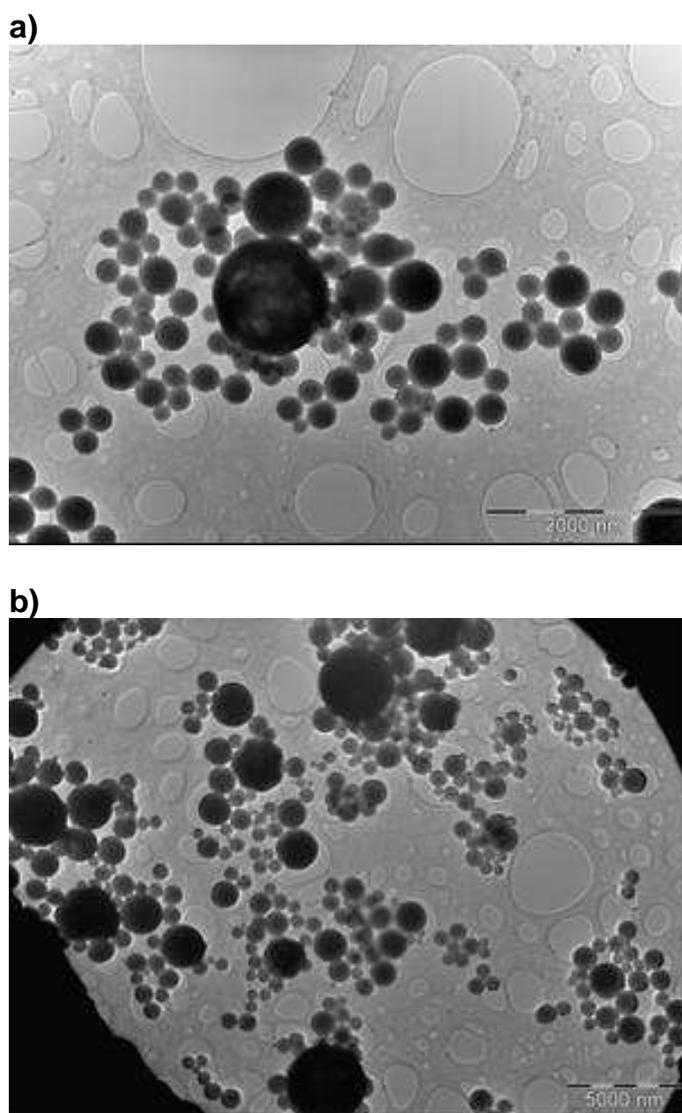


Figura 54: Imagens de MET das esferas de dextrina contendo TPPS₄ veiculada.

As imagens de MET confirmaram a forma esférica e a grande dispersão no tamanho das partículas.

c) Porcentagem de TPPS₄ associada às nanoesferas de dextrina e eficiência de encapsulação

Após as amostras terem sido analisadas por espectroscopia UV-Vis, foi possível determinar a massa de TPPS₄ presente dentro e fora das nanoesferas de dextrina, utilizando-se os valores de absorbância em 414 nm e a respectiva curva de calibração. Os resultados obtidos e a da eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores obtidos de massa de TPPS₄ e Eficiência de Encapsulação da TPPS₄ em 10,0 mg de nanoesferas de dextrina. Média de 3 determinações.

	Massa (µg)
TPPS ₄ externa	2,5
TPPS ₄ interna	88,3
TPPS ₄ total	90,8
Eficiência de Encapsulação = 97,2%	
Eficiência de Encapsulação Teórica = 90,8%	

A partir destes resultados é possível verificar que a TPPS₄ foi encapsulada em nanoesferas de dextrina com elevada eficiência. O resultado obtido está de acordo com a literatura, que ressalta a potencialidade do processo *spray drying* para encapsulação, em larga escala e com alta eficiência de incorporação, de fármacos em nano/micropartículas.^{100,128}

A porcentagem de TPPS₄ presente nas nanoesferas de dextrina, ou taxa de associação, foi determinada em **0, 91%**.

4.3.4. Considerações finais sobre as encapsulações realizadas em dextrina

As encapsulações da TPPS₄ e da MnTPPS₄ em nanoesferas de dextrina foram realizadas com elevada eficiência (maior que 95%). Entretanto, não há relatos na literatura sobre a utilização deste polissacarídeo como agente encapsulante. Além disso, a dextrina é um polímero hidrofílico (solúvel em água) e esta propriedade inviabiliza sua aplicação como veículo carregador para liberação controlada de fármacos, uma vez que o plasma (líquido amarelo claro que representa 55% do volume total de sangue) é constituído por 90% de água, onde se encontram dissolvidas proteínas, açúcares, gorduras e sais minerais.¹²⁹

Por outro lado, as encapsulações neste polímero foram muito importantes para o desenvolvimento de um *spray dryer* e para o estabelecimento de uma metodologia de encapsulação. Além disso, a dextrina pode também ser utilizada para outros fins de encapsulação que requerem liberação rápida.

4.4. Estudo espectroscópico da TPPS₄ encapsulada em nanoesferas de dextrina

Os sistemas porfirínicos de ocorrência natural são protegidos e preservados em sua forma monomérica pelos polímeros biológicos (proteínas), como o grupo heme na hemoglobina e mioglobina.¹³⁰

A agregação afeta consideravelmente as características espectrais e energéticas das porfirinas, reduzindo o rendimento quântico e o tempo de vida do estado excitado (singlete ou triplete). Uma solução possível para este problema é encapsular a porfirina em nanoesferas poliméricas, proporcionando um ambiente onde o fotossensibilizador pode ser administrado em sua forma monomérica.¹¹

Com o intuito de verificar se a TPPS₄ encontrava-se agregada nas partículas e comprovar que o processo *spray drying* não degradou a porfirina, as nanoesferas foram analisadas por espectroscopia de fotoluminescência e por absorção/reflectância difusa no UV-Vis. Os resultados obtidos foram comparados com o de misturas físicas de TPPS₄ e dextrina.

4.4.1. Espectroscopia eletrônica de fotoluminescência

Inicialmente, o espectro de excitação da TPPS₄ nanoencapsulada em dextrina foi registrado Figura 55a. Os espectros de emissão da TPPS₄ presente nas misturas físicas e nanoencapsulada são apresentados na Figura 55b,c . A Figura 55b mostra os espectros de emissão da TPPS₄ em diferentes porcentagens (0.2, 0.3, 0.8 e 1.0% m/m) nas misturas físicas com dextrina. Estes espectros contêm as bandas de emissão em 650 e 710 nm que são características da porfirina base livre em solução aquosa (Figura 56). A Figura 55c apresenta o espectro de emissão da TPPS₄ nanoencapsulada. É possível verificar que as bandas de emissão em 650 e 710 nm que são características da porfirina base livre em solução aquosa estão presentes, indicando que o processo *spray drying* não ocasionou nenhuma mudança estrutural. Como mencionado no item 3.4, as nanoesferas de dextrina utilizadas neste estudo contêm 0,7% em massa de TPPS₄. Entretanto, estas partículas exibem maior intensidade de emissão que uma mistura física contendo maior porcentagem de

TPPS₄ (0,8% m/m). Este comportamento pode ser observado na Figura 55d e explicado com base na morfologia da partícula como discutiremos com base nos resultados de MEV a seguir.

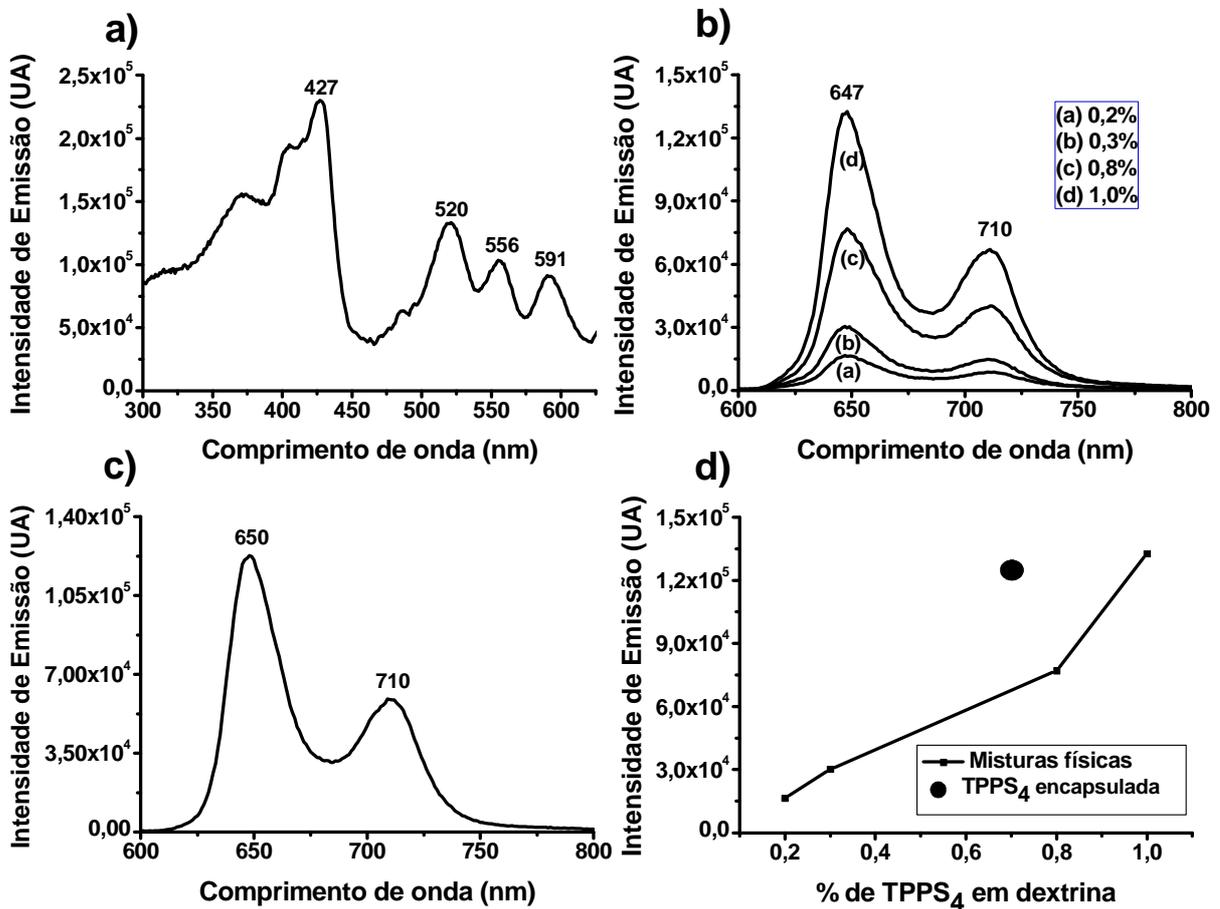


Figura 55: a) Espectro de excitação da TPPS₄ nanoencapsulada (0.7% m/m) ($\lambda_{em} = 650$ nm). Espectros de emissão da TPPS₄: b) nas misturas físicas e c) nanoencapsulada (0.7% m/m). d) Comparação entre as intensidades de emissão em 650 nm da TPPS₄ nanoencapsulada e presente nas misturas físicas ($\lambda_{exc} = 520$ nm).

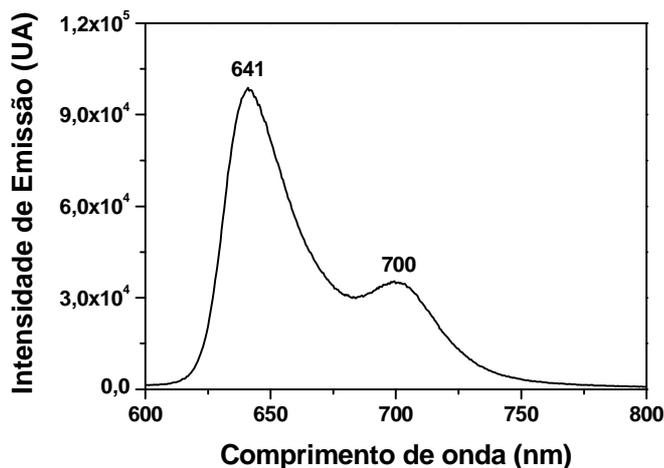


Figura 56: Espectro de emissão da TPPS₄ em solução aquosa ($1,9 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹).

4.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de MEV da Figura 57 revelam que as partículas da mistura física não apresentam morfologia definida e são maiores (~10 vezes) do que as nanoesferas. A encapsulação é responsável pela distribuição mais eficiente das moléculas de TPPS₄ nas esferas, proporcionando um ambiente onde a porfirina pode ser mantida na sua forma monomérica e ocasionando emissões com maior intensidade.

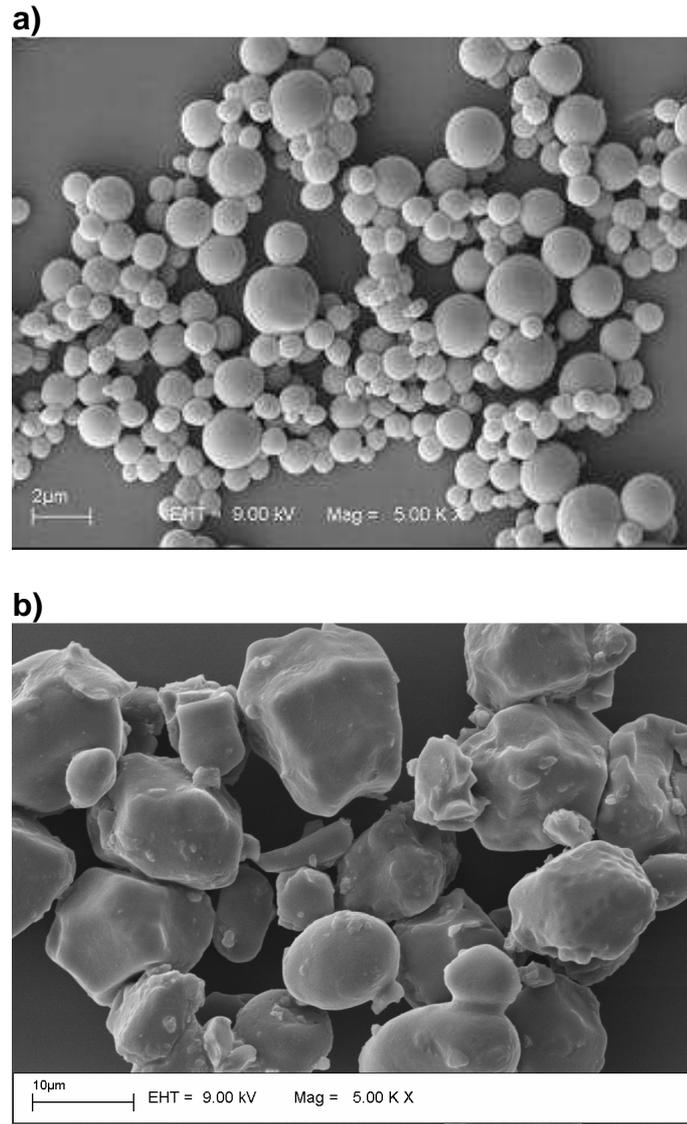


Figura 57: Imagens de MEV da TPPS₄ a) encapsulada em nanoesferas de dextrina (0,7% m/m) e b) presente nas misturas físicas (0,8% m/m).

4.4.3 Absorção/reflectância difusa no ultravioleta-visível

Os espectros de absorção da TPPS₄ nanoencapsulada e presente na mistura física (Figura 58), obtidos a partir da análise de reflectância difusa utilizando a função remissão de Kubelka Munk, estão de acordo com o espectro de absorção eletrônica desta porfirina em solução aquosa (Figura 49a).

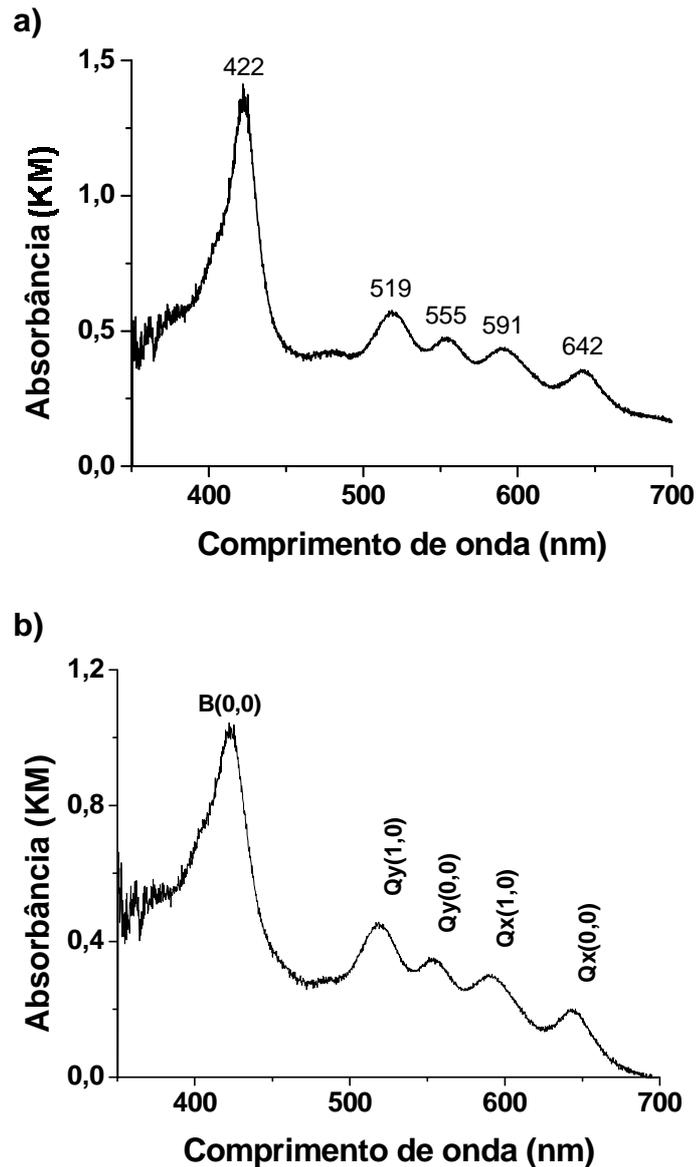


Figura 58: Espectros de absorção da TPPS₄ a) encapsulada em nanoesferas de dextrina (0,7% m/m) e b) presente nas misturas físicas (0,8% m/m). KM = Kubelka Munk.

Conforme foi discutido no 4.3, podemos ver que o espectro eletrônico da TPPS₄, está de acordo com o modelo dos Quatro Orbitais de Fronteira proposto por Gouterman^{124,125}. Nos espectros da Figura 58, podemos verificar a presença da banda Soret em 422 nm e quatro bandas de menor intensidade entre 500 e 700 nm, chamadas bandas Q. Já foi discutido, que o modelo dos quatro orbitais atribui à banda Soret a transição do orbital molecular ocupado e simetria a_{1u} , para o orbital molecular desocupado de menor energia e simetria e_g . No caso das porfirinas (D_{2h})

há um desdobramento dos orbitais degenerados $e_{g_{x,y}}$, e desta forma as quatro bandas Q são devidas a transições do orbital a_{2u} para os níveis vibracionais 0 e 1 dos orbitais excitados e_{g_x} e e_{g_y} .

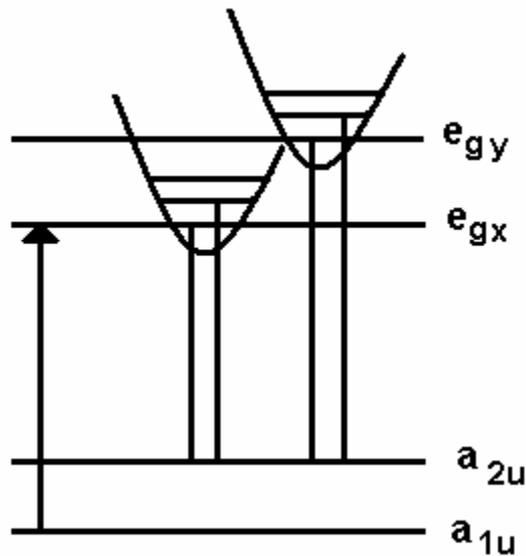


Figura 59: Diagrama de níveis de energia dos orbitais π de uma porfirina.

4.5. Determinação do grau de acetilação da quitosana

A região mais importante do espectro de ^1H RMN da quitosana para a determinação do respectivo grau de acetilação é mostrada na Figura 60, seguindo as atribuições de sinais descritas na literatura.^{83,131}

O grau de acetilação foi determinado a partir das intensidades das integrais dos prótons metílicos do grupo acetoamida, I_{met} , relacionando-os com as intensidades das integrais dos prótons dos anéis glicosídicos.

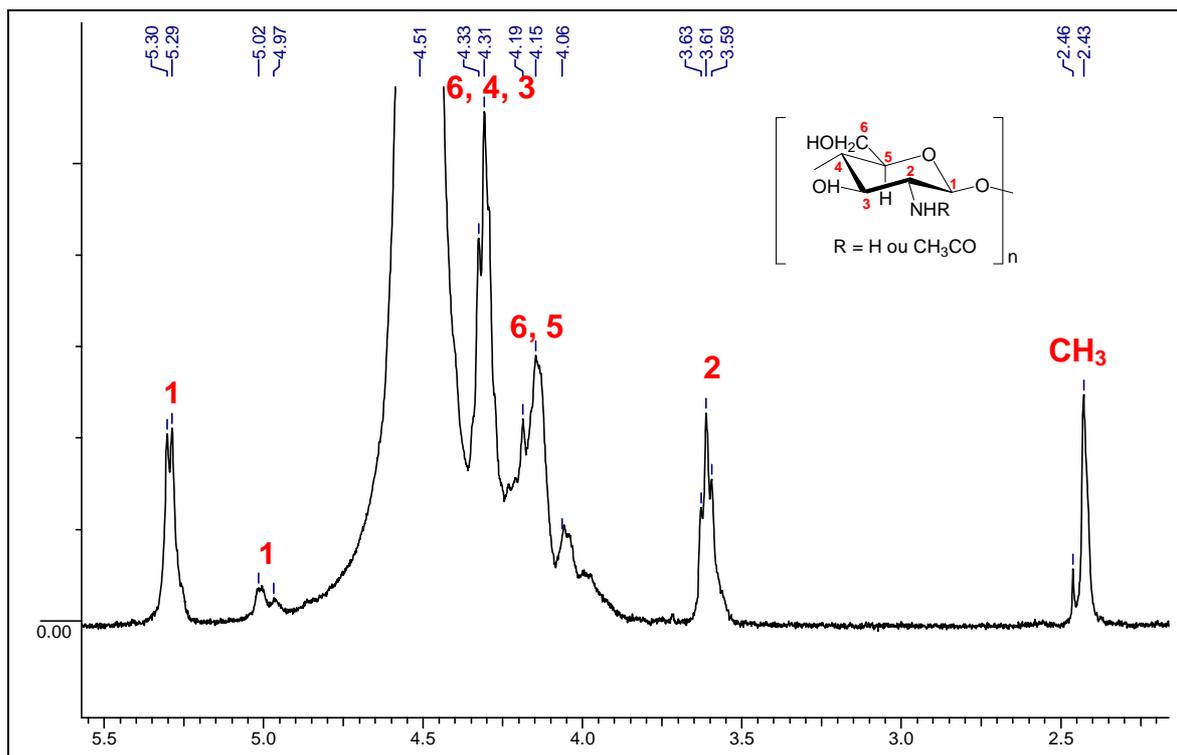


Figura 60: Espectro de ^1H RMN de uma solução 1% de quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100:1 v/v).

Os cálculos foram feitos utilizando as equações expressas abaixo e o grau de acetilação foi determinado como o valor médio resultante das duas equações.⁸³

$$\% \text{GA} = [I_{\text{met}}/3] / (I_{\text{H}_2}) \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

$$\% \text{GA} = [I_{\text{met}}/3] / [I_{\text{H}_2/6}/6] \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

- I_{met} : intensidade da integral do sinal dos prótons metílicos dos grupos acetoamida,
- I_{H_2} : intensidade da integral do sinal do átomo de H ligado ao carbono 2 do anel glicosídico,
- $I_{\text{H}_2/6}$: soma das intensidades das integrais dos sinais dos átomos de hidrogênios ligados aos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 do anel glicosídico.

Com base nestas considerações o grau de acetilação da quitosana utilizada foi determinado como sendo 22,5%.

4.6. Produção de nanoesferas de quitosana por spray drying

Com base nas importantes características da quitosana, como não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, discutidas de maneira mais detalhada no item 1.6, este polímero foi escolhido como matriz polimérica.^{88,89} Antes de serem iniciados estudos de encapsulação em quitosana, foram preparadas nanoesferas somente do polímero. O pó obtido pelo processo *spray drying* foi caracterizado por MEV e DRX (difratograma apresentado no item 4.7).

4.6.1. Microscopia eletrônica de varredura

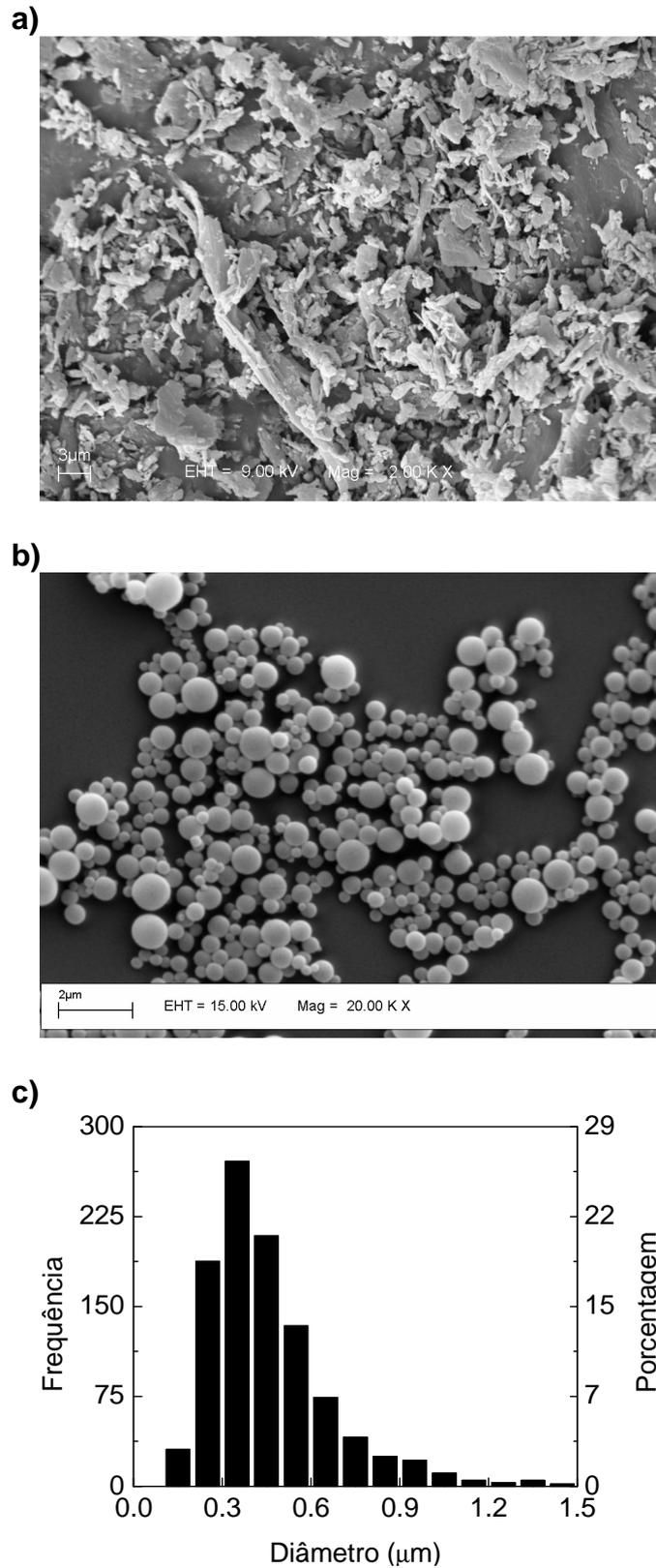


Figura 61: a) e b) imagens de MEV da quitosana comercial e nanoesférica; c) distribuição do diâmetro das nanoesferas.

Até este ponto do trabalho, o sistema desenvolvido pelo grupo estava sendo utilizado para a produção de nanoesferas de dextrina e para a encapsulação de porfirina e metaloporfirina nesta matriz. Porém, a partir das Figura 61b,c, ficou clara a versatilidade deste *spray dryer*, que possibilitou a produção de nanoesferas de quitosana, uma vez que as partículas da quitosana comercial são maiores e não têm morfologia definida.

A distribuição do tamanho das partículas preparadas foi determinada a partir da análise de aproximadamente 1000 nanoesferas das imagens de MEV. A partir do histograma da Figura 61c foram determinados o diâmetro médio e o respectivo desvio padrão das nanoesferas de quitosana: **460 ± 210 nm**.

4.6.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

- Quitosana comercial

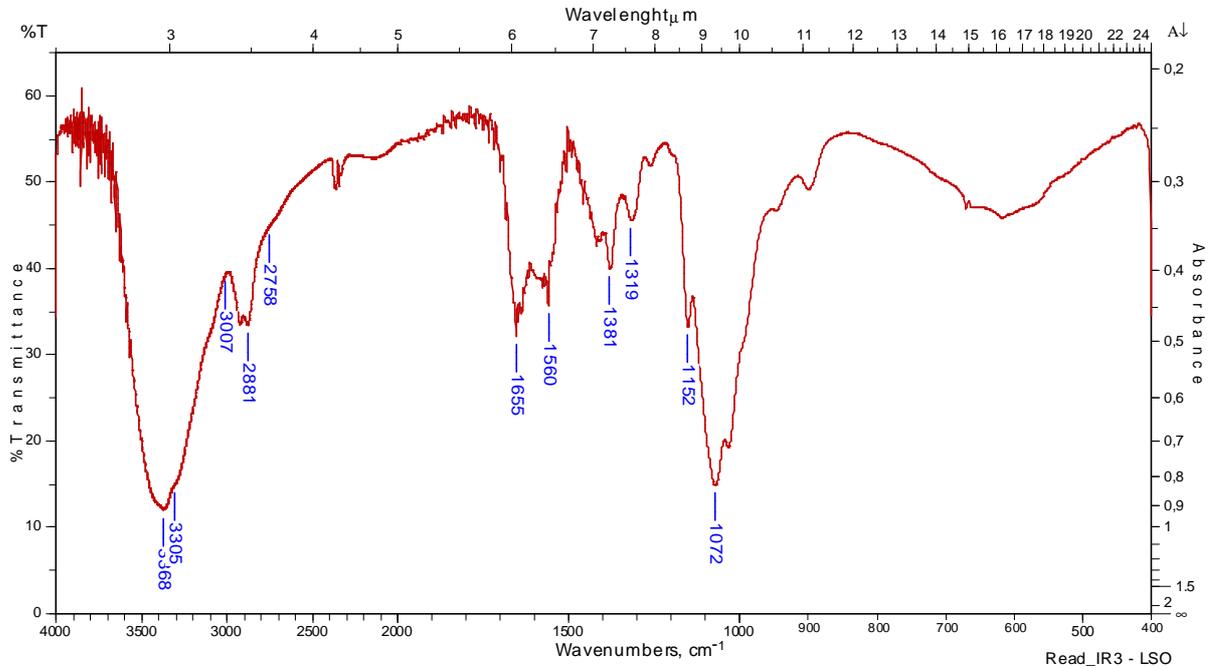


Figura 62: Espectro de infravermelho da quitosana comercial.

- Nanoesferas de quitosana

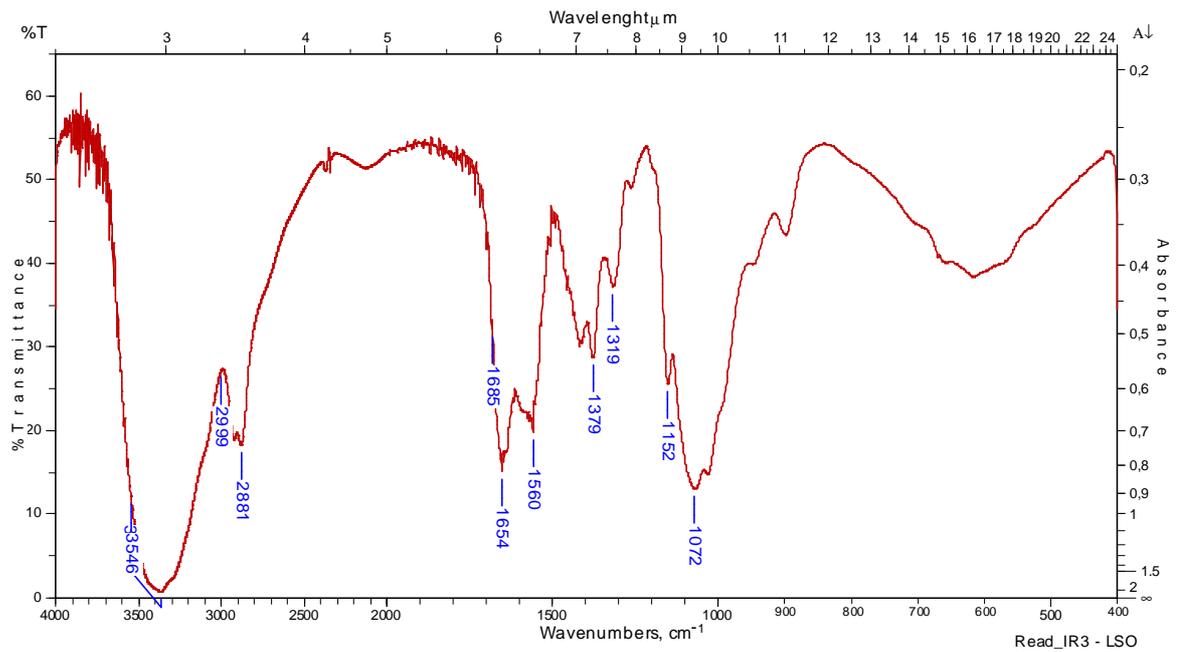


Figura 63: Espectro de infravermelho das nanoesferas de quitosana produzidas.

A partir da Figura 62 e da Figura 63 podemos verificar que os espectros de infravermelho da quitosana comercial e nanoesférica são similares e apresentam bandas características, permitindo-nos afirmar que o processo *spray drying*, e conseqüentemente, as condições escolhidas no procedimento não ocasionaram nenhuma alteração na quitosana. As atribuições das principais bandas presentes nos espectros encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Bandas presentes nos espectros de infravermelho da quitosana comercial e nanoesférica.

Grupo funcional	Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
CH ₃	2881	estiramento simétrico
	1380	deformação simétrica
CH ₂	2925	estiramento assimétrico
C-N	1319	estiramento
C=O	1654	estiramento
C-O	1072	estiramento
N-H	1560	estiramento

4.7. Encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana por *spray drying*

Em virtude das desejáveis características da quitosana e na potencial aplicação da TMPyP em TFD experimental, comentada nos itens 1.4 e 1.5, decidiu-se encapsular a TMPyP em quitosana. O pó obtido foi analisado por MEV, DRX e por absorção/reflectância difusa no UV-Vis.

4.7.1. Microscopia eletrônica de varredura

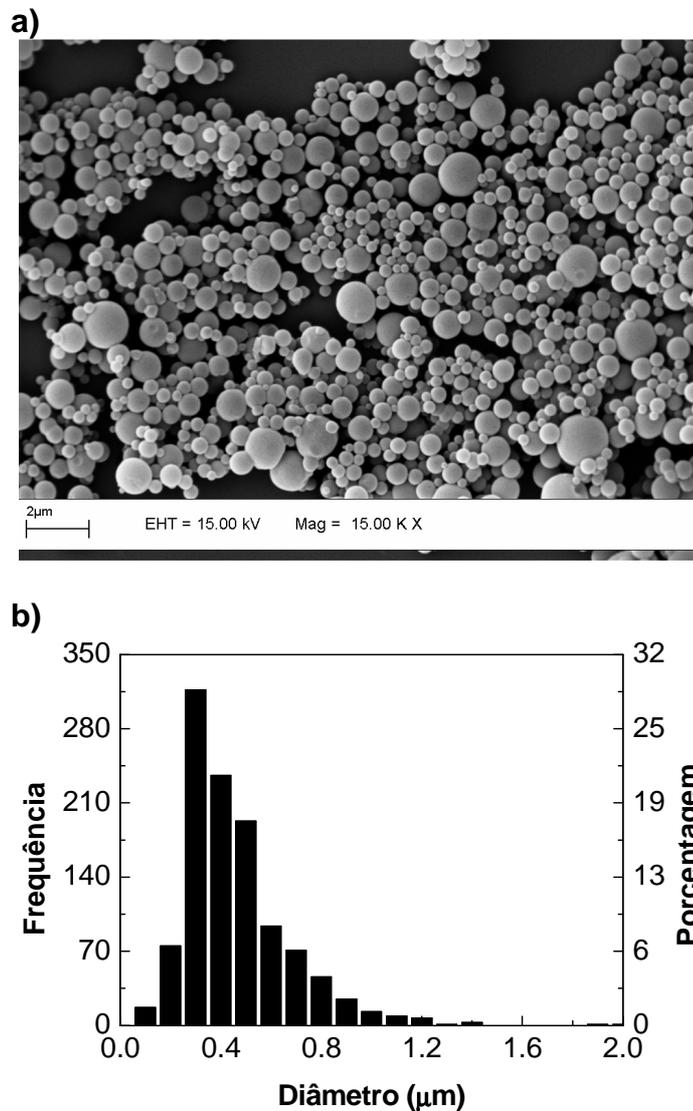


Figura 64: a) Imagem de MEV das esferas de quitosana contendo TMPyP veiculada e b) distribuição do diâmetro destas partículas.

A imagem de MEV confirmou a morfologia esférica das partículas (Figura 64a), cuja distribuição de tamanho foi determinada a partir da análise de aproximadamente 1000 nanoesferas presentes nas imagens de MEV. A partir do histograma da Figura 64b foram determinados o diâmetro médio e o respectivo desvio padrão das nanoesferas de quitosana contendo TMPyP veiculada: **460 ± 210 nm**.

4.7.2. Difração de raio-x

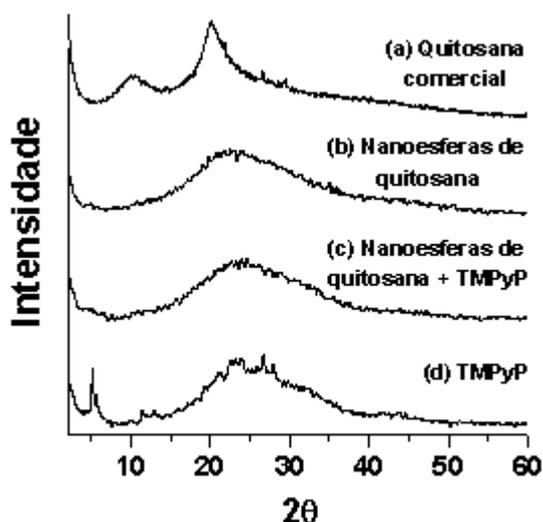


Figura 65: Difratogramas: (a) quitosana comercial, (b) nanoesferas de quitosana produzidas por *spray drying*, (c) TMPyP veiculada em nanoesferas de quitosana e (d) TMPyP comercial.

O difratograma obtido para a quitosana comercial (Figura 65a) está de acordo com publicados na literatura.^{132,133,134,135} Como é possível observar, a quitosana pura apresenta dois picos de difração em $2\theta = 10$ e 20° , que são devidos à existência de regiões amorfas e cristalinas, respectivamente. O pico em $2\theta = 10^\circ$ é considerado um pico de espalhamento das regiões amorfas da quitosana. Porém, a presença do pico em $2\theta = 20^\circ$ permite classificar a quitosana como um polímero semicristalino.

Por outro lado, na Figura 65b nota-se que a produção de nanoesferas de quitosana pelo processo de *spray drying* ocasionou a perda dos domínios cristalinos da estrutura polimérica. Assim, o que se observa é apenas um halo de difração, indicando um estado amorfo.¹³²

O estado físico de um fármaco na matriz polimérica é um parâmetro importante no estudo da cinética de liberação do fármaco a partir dos veículos carregadores. O estado físico do fármaco pode variar de dispersão molecular (amorfa) até estruturas cristalinas bem definidas.¹³⁶

A TMPyP comercial, da mesma forma que a quitosana comercial, apresenta picos de difração que desaparecem após sua veiculação nas nanoesferas poliméricas pela técnica de *spray drying*, Figura 65c,d. Esta ausência de domínios cristalinos da TMPyP veiculada pode ser devida à: (i) baixa porcentagem de TMPyP em relação à quitosana e (ii) TMPyP ter estrutura amorfa nas nanoesferas.

4.7.3. Absorção/reflectância difusa no ultravioleta-visível

Com o intuito de verificar se o processo *spray drying* ocasionou a degradação, ou alguma mudança na TMPyP, o espectro de absorção deste material foi realizado a partir de medida de reflectância difusa no UV-Vis utilizando a função remissão de Kubelka Munk. A TMPyP em solução aquosa foi utilizada como padrão e, para isso, foi analisada por espectroscopia UV-Vis.

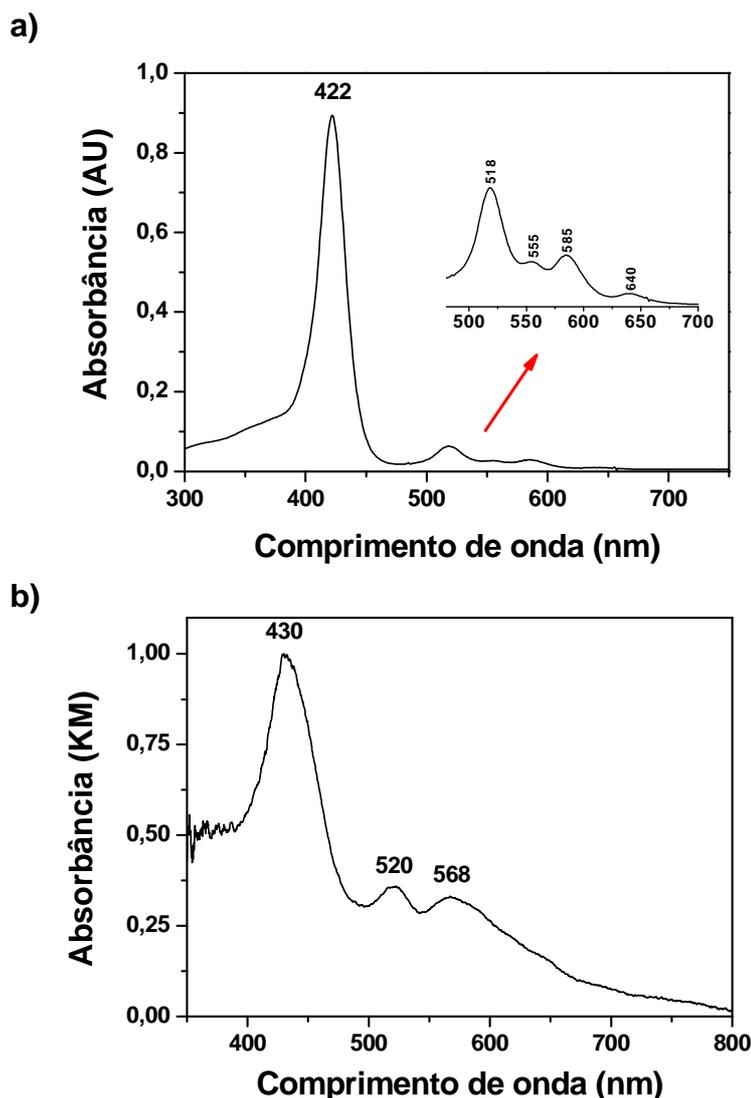


Figura 66: Espectro de absorção UV-Vis da TMPyP a) livre em solução aquosa ($2,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e b) encapsulada em nanoesferas de quitosana. KM= Kubelka Munk.

O espectro de absorção UV-Vis da TMPyP nanoencapsulada em quitosana está de acordo com o espectro de absorção eletrônica desta porfirina livre em solução aquosa (Figura 66).

Podemos ver que o espectro eletrônico da TMPyP em solução aquosa (Figura 66a) está de acordo com o modelo dos Quatro Orbitais de Fronteira proposto por Gouterman^{124,125}. Neste espectro estão presentes a banda Soret em 422 nm e as quatro bandas Q. No espectro da TMPyP encapsulada (Figura 66b) estão presentes a banda Soret duas bandas Q de fácil visualização. As outras duas bandas Q são

difíceis de observadas devido ao espalhamento ocasionado pela pequena dimensão das partículas.

4.7.4. Porcentagem de TMPyP associada às nanoesferas de quitosana e eficiência de encapsulação

Após as amostras terem sido analisadas por espectroscopia UV-Vis, foi possível determinar a massa de TMPyP presente dentro e fora da nanoesferas de quitosana, utilizando-se os valores de absorbância em 422 nm e a respectiva curva de calibração. Os resultados obtidos e a da eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores obtidos de massa de TMPyP e Eficiência de Encapsulação da TMPyP em 8,0 mg de nanoesferas de quitosana. Média de 3 determinações.

	Massa (μg)
TMPyP externa	6,3
TMPyP interna	51,9
TMPyP total	58,2
Eficiência de Encapsulação = 89,2%	
Eficiência de Encapsulação Teórica = 64,8%	

A partir destes resultados é possível verificar que a TMPyP foi encapsulada em nanoesferas de quitosana com elevada eficiência, que está de acordo com a literatura e que ressalta a potencialidade do processo *spray drying* para encapsulação, em larga escala e com alta eficiência de incorporação, de fármacos em nano/micropartículas.^{100,128}

A porcentagem de TMPyP presente nas nanoesferas de quitosana, ou taxa de associação, foi determinada em **0,73%**.

Conforme foi discutido na introdução, há relatos na literatura a respeito do acúmulo preferencial de corantes catiônicos em células malignas comparativamente às células saudáveis, o qual é atribuído ao fato de mitocôndrias absorverem espécies catiônicas em maior proporção do que células normais.^{137,138,139} Além disso, a quitosana é um polissacarídeo catiônico e, em condições básicas ou neutras, contém grupos amino livres e é insolúvel em água, podendo atuar como veículo de liberação controlada. Baseados nestes fundamentos teóricos, a aplicabilidade da quitosana como sistema carregador foi verificada a partir de estudos do perfil de liberação da TMPyP veiculada. Além disso, a cito e fotocitotoxicidade das nanoesferas vazias e da TMPyP livre e incorporada nas partículas de quitosana foram avaliadas. A interação da TMPyP com monocamadas lipídicas, mediada ou não por quitosana, também auxiliou na discussão da aplicabilidade deste polissacarídeo como veículo carregador para TFD.

4.8. Avaliação do perfil de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana.

A quitosana vem sendo explorada como veículo carregador que proporcione um perfil de liberação desejável, uma vez que as microesferas deste polissacarídeo propiciam a liberação controlada de várias drogas (analgésico, anti-inflamatório, vitamina), aumentam a biodisponibilidade de substâncias degradáveis e aumentam a retenção de substâncias hidrofílicas através das camadas epiteliais.^{80,91,94,136} O desenvolvimento destas pesquisas é possível através dos estudos de liberação *in*

vitro, que têm sido considerados uma ferramenta farmacêutica importante na elaboração de novos fármacos e veículos carregadores.¹⁴⁰

Em nosso estudo do perfil de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana, a porcentagem de porfirina liberada foi determinada através de uma curva de calibração obtida pelo método da adição padrão por espectroscopia de fotoluminescência. Cada valor de porcentagem presente no gráfico da Figura 67 corresponde à média de 3 determinações.

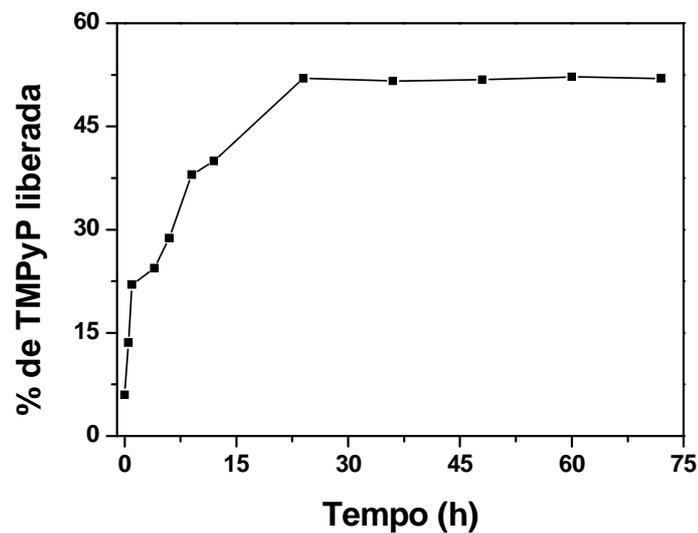


Figura 67: Perfil de liberação, em tampão fosfato pH 7,4, da TMPyP incorporada nas nanoesferas de quitosana.

Conforme podemos observar pela Figura 67, na fase inicial, conhecida como *burst*, cerca de 22% da TMPyP foi liberada das nanopartículas na primeira hora. Esta liberação inicial pode ser atribuída à porfirina que não foi encapsulada, ou seja, localizada na superfície das partículas. A liberação *burst* foi seguida por uma liberação lenta de mais 30% em 24 horas, atingindo o máximo de liberação (52%) que permaneceu constante até o final do experimento (72 horas).

Com o objetivo de explicar o modo de liberação das nanopartículas de quitosana carregadas com TMPyP, os valores de liberação foram analisados através

dos seguintes modelos matemáticos: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, modelo de Higuchi e modelo de Korsmeyer.

Após analisarmos os dados de liberação através dos modelos matemáticos mencionados, pudemos verificar que o melhor estudo cinético foi alcançado com o modelo de Higuchi (Figura 68), indicando que o mecanismo de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana é por difusão. Este resultado está de acordo com a literatura, que menciona a liberação de drogas hidrossolúveis incorporadas em matrizes polimérica principalmente por difusão. Já para os fármacos pouco solúveis em água o mecanismo principal de liberação é por erosão da matriz.¹⁴⁰

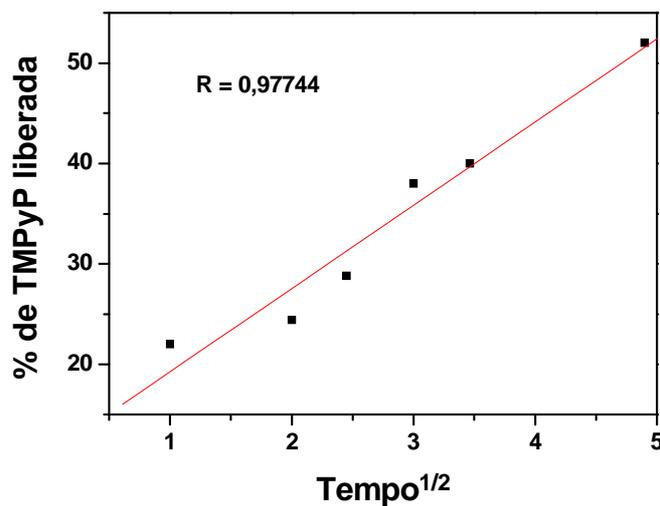


Figura 68: Modelo cinético de Higuchi para a liberação da TMPyP, em tampão fosfato pH = 7,4, veiculada em nanoesferas de quitosana.

4.9. Estudos de cito e fotocitotoxicidade das nanoesferas de quitosana, TMPyP livre e TMPyP encapsulada em nanoesferas de quitosana.

4.9.1. Estudos de citotoxicidade

Um composto fotossensível utilizado como fármaco ativo na TFD não deve apresentar toxicidade na ausência de irradiação, uma vez que o dano fotodinâmico somente é alcançado quando há a combinação deste fotossensibilizador com luz. Desta forma, é fundamental que o fármaco permaneça inativo, ou seja, não apresente citotoxicidade na ausência de condições apropriadas para sua ação.

A concentração não-citotóxica corresponde à concentração na qual é mantida a viabilidade celular, ou seja, quando a porcentagem de morte das células está dentro do limite basal, que é específico para cada linhagem. A linhagem J774-A1 tem como limite basal a taxa de 8 a 10% de morte. Os experimentos para se determinar qual a concentração não-citotóxica do fotossensibilizador sobre a cultura de células J774-A1 foram realizados com diferentes concentrações de porfirina incorporada em nanoesferas de quitosana, onde averiguamos o efeito concentração-dependente sobre esta linhagem celular (Figura 69).

Foram testadas três concentrações diferentes do fármaco incorporado às nanopartículas: 1,0, 3,0 e 5,0.10⁻⁶ mol L⁻¹.

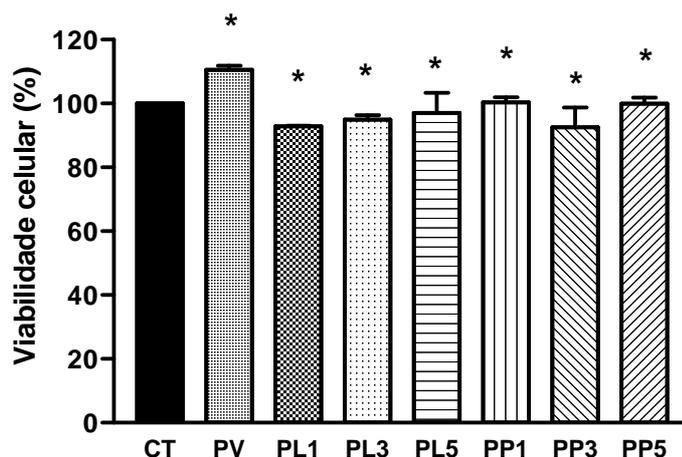


Figura 69: Viabilidade celular da linhagem J774-A11 após 3 horas de incubação com as amostras estudadas: CT = controle interno, PV = nanoesferas de quitosana vazias, PL1 = TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, PL3 = TMPyP $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, PL5 = TMPyP $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, PP1 = TMPyP/quitosana $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, PP3 = TMPyP/quitosana $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, PP5 = TMPyP/quitosana $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-Way ANOVA seguido pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias \pm SEM (Standard error of the mean) (n=3). Valores de P: * $p > 0,05$ com relação ao controle.

Os resultados de viabilidade celular se encontram sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7: Viabilidade celular após a incubação por 3 horas com as amostras estudadas.

	Viabilidade Celular (%) \pm SEM
PV (nanoesferas de quitosana vazias)	110 \pm 1,2
PL1 (TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	93 \pm 0,25
PL3 (TMPyP $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	95 \pm 1,5
PL5 (TMPyP $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	97 \pm 6,0
PP1 (TMPyP:quitosana $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	100 \pm 1,6
PP3 (TMPyP:quitosana $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	92 \pm 6,0
PP5 (TMPyP:quitosana $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	100 \pm 1,9

Os resultados de citotoxicidade indicam que não há diferença estatística significativa entre o controle e os grupos analisados, ou seja, as propriedades

citotóxicas da TMPyP não foram ativadas. Observou-se também que as nanoesferas de quitosana vazias não apresentam citotoxicidade significativa.

A concentração da TMPyP na qual a viabilidade celular se manteve dentro do limite basal corresponde a $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, sendo esta a concentração adotada para os estudos *in vitro* complementares ao tratamento das células com irradiação.

4.9.2. Estudos de fotocitotoxicidade

A Terapia Fotodinâmica é baseada na interação de um fotossensibilizador com luz no tecido maligno. A extensão do dano fotodinâmico é altamente dependente da acumulação intracelular do fármaco fotossensível, levando a morte celular, seja por necrose ou apoptose celular.

Em vista disso, realizamos experimentos de fotocitotoxicidade para a TMPyP incorporada em nanoesferas de quitosana na concentração não-citotóxica para as células J774-A1, averiguando o efeito dose-dependente sobre esta linhagem, levando ao efeito fotodinâmico desejado.

Foram testadas duas diferentes doses de irradiação (5 e 10 J cm^{-2}) sobre as células tratadas com TMPyP livre e incorporada nas nanopartículas na concentração de $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 70).

Os resultados foram confirmados por experimentos em triplicata e o tratamento estatístico foi avaliado pelo *One Way ANOVA* e seguido pelo teste-t Newman-Keuls, sendo considerado valores significativamente diferentes quando $P < 0.05$.

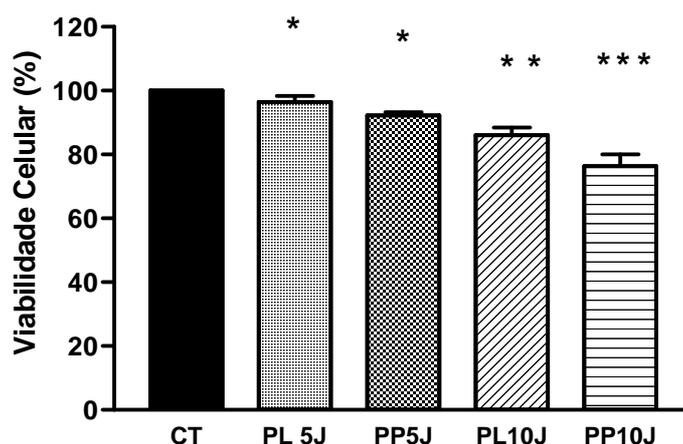


Figura 70: Viabilidade celular da linhagem J774-A1 após 3 horas de incubação com as amostras estudadas: CT = controle interno irradiado com 10 J, PL5J= TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 5 J cm⁻², PP5J = TMPyP/quitosana $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 5 J cm⁻², PL10J = TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 10 J cm⁻², PP10J = TMPyP/quitosana $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ irradiada com 10 J cm⁻². Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-Way ANOVA seguido pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias \pm SEM (n=3). Valores de P: * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$ e *** $p < 0.01$ com relação ao controle.

Os resultados de viabilidade celular se encontram sumarizados na Tabela 8:

Tabela 8: Viabilidade celular após a incubação por 3 horas com as amostras estudadas e aplicação de luz nas doses 5 e 10 J cm⁻².

	Viabilidade Celular (%) \pm SEM
PL5J (TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹ irradiada com 5 J cm ⁻²)	96 \pm 2,0
PP5J (TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹ irradiada com 5 J cm ⁻²)	92 \pm 1,0
PL10J (TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹ irradiada com 10 J cm ⁻²)	86 \pm 2,5
PP10J (TMPyP $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹ irradiada com 10 J cm ⁻²)	76 \pm 3,6

Através dos experimentos de fotocitotoxicidade conseguimos delinear o perfil do efeito dose-dependente sobre as células da linhagem J774-A1.

Os resultados obtidos na avaliação da fotocitotoxicidade indicam que não há diferença estatística significativa entre o controle e as amostras PL5J ($p > 0.05$) e

PP5J ($p > 0.05$). Por outro lado os resultados mostram que há diferença estatística significativa entre o controle e as amostras PL10J ($p < 0.05$) e PP10J ($p < 0.01$).

Desta forma podemos concluir que o maior efeito fotodinâmico foi alcançado com PP10J e dose de irradiação de 10 J cm^{-2} , conseguindo uma morte celular de cerca de 25%.

Estes dados nos mostram o aumento na eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador quando este se encontra em condições apropriadas para a sua ação, ou seja, concentração, sistema de liberação e dose de irradiação adequados.

4.10. Estudo da interação entre a TMPyP e monocamadas lipídicas mediada por quitosana como agente bioadesivo

As membranas celulares são estruturas laminares constituídas por duas camadas lipídicas, sendo os fosfolipídios a principal classe dos lipídios de membrana, onde estão inseridas moléculas protéicas e receptores específicos (Figura 71). Desta forma, as membranas celulares podem ser consideradas como duas monocamadas lipídicas fracamente ligadas, o que tem motivado o uso de monocamadas de Langmuir e filmes LB como modelos de membrana por serem capazes de mimetizar o empacotamento lipídico lamelar.

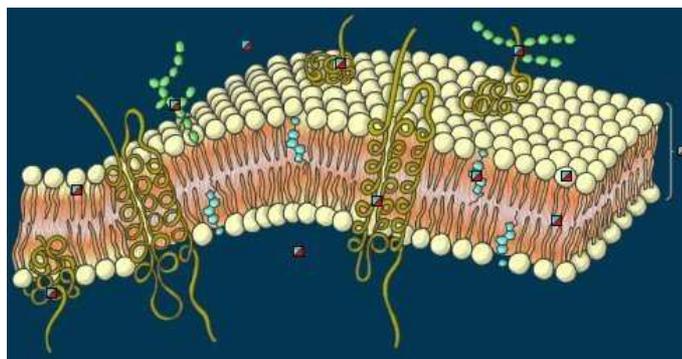


Figura 71: Membrana celular.¹¹⁴

Esta etapa do trabalho consistiu no estudo da interação da TMPyP com monocamadas de Langmuir do lipídio DPPG através de medidas de tensão e elasticidade superficiais. Além disso, esta interação também foi estudada a partir de filmes LB de DPPG utilizando ou não a quitosana como agente mediador.

4.10.1. Método da gota pendente

A interação da TMPyP com monocamadas de DPPG foi inicialmente estudada através de medidas de tensão e elasticidade superficiais pelo método da gota pendente.

Após formar a monocamada de DPPG na gota de uma solução aquosa de TMPyP $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 30), a gota foi expandida até obter uma pressão superficial de aproximadamente 30 mN m^{-1} , valor médio correspondente àquele de biomembranas.¹¹⁵ A cinética de adsorção da TMPyP à monocamada de DPPG foi realizada até a tensão superficial do sistema atingir um valor constante (Figura 72).

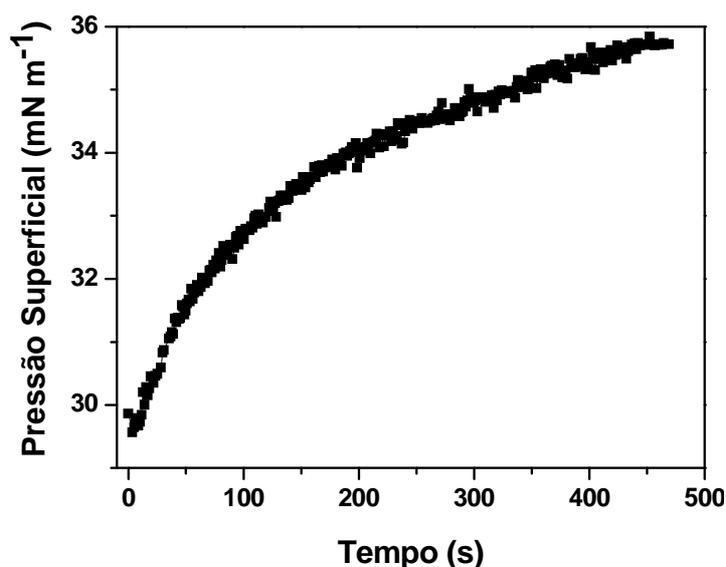


Figura 72: Cinética de adsorção da TMPyP na monocamada de DPPG mantida inicialmente a 30 mN m^{-1} .

Pela Figura 72, podemos verificar que a tensão superficial do sistema atingiu o equilíbrio em, aproximadamente, 450 segundos e a TMPyP alterou a pressão superficial da monocamada de DPPG para, aproximadamente, 36 mN m^{-1} . Este resultado sugere uma forte interação entre a porfirina e a monocamada lipídica.

Após estabilizar a tensão superficial, o sistema em equilíbrio foi perturbado e a oscilação na gota foi iniciada. Conforme Nobre e colaboradores a elasticidade superficial de um sistema composto por uma monocamada de DPPG formada na superfície de uma gota de água é $206,5 \text{ mN m}^{-1}$, a 30 mN m^{-1} . No presente experimento, o sistema composto pela monocamada de DPPG formada na superfície da solução de TMPyP foi 120 mN m^{-1} . Esta redução na elasticidade superficial para o sistema contendo porfirina indicou que a TMPyP expande a monocamada interagindo na interface lipídio-ar, alterando o empacotamento lipídico, provavelmente devido a fortes interações eletrostáticas decorrentes do sistema de cargas opostas. A monocamada tornou-se mais fluida e expandida em virtude da adsorção da TMPyP. (Figura 73).

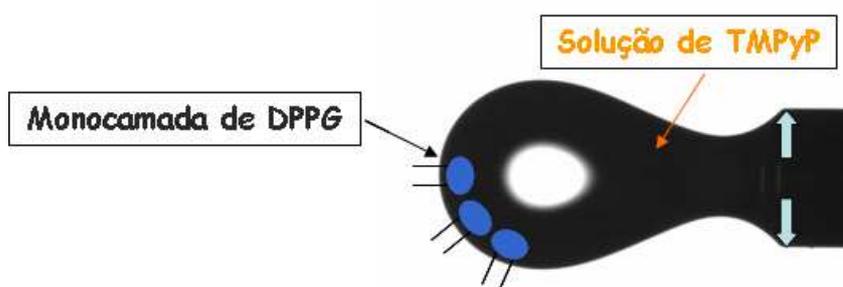


Figura 73: Micrografia obtida pelo método da gota pendente.

4.10.2. Filmes Langmuir-Blodgett

A segunda etapa do estudo da interação da TMPyP com monocamada lipídica consistiu na formação de filmes LB de DPPG contendo ou não quitosana.

a) Filme LB composto por DMPA + DPPG

No caso do filme constituído por DMPA + DPPG, foram realizadas três imersões de 0,5 minuto na solução de TMPyP. Como a massa de porfirina incorporada praticamente não variou com estas deposições (175 ng), decidiu-se fazer uma imersão de 2 minutos. Esta última imersão ocasionou a dessorção da TMPyP do filme. A massa total de porfirina adsorvida neste filme foi 70 ng e sua presença no filme foi confirmada por espectroscopia de fotoluminescência (Figura 74).

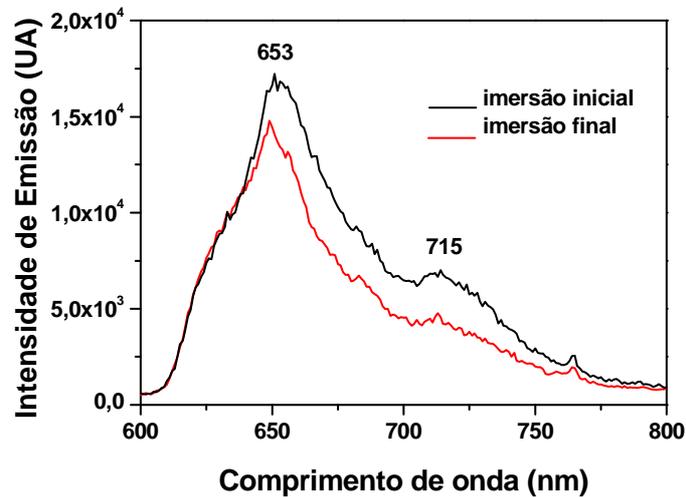


Figura 74: Espectros de emissão da TMPyP incorporada no filme LB de DMPA+ DPPG ($\lambda_{exc} = 515$ nm).

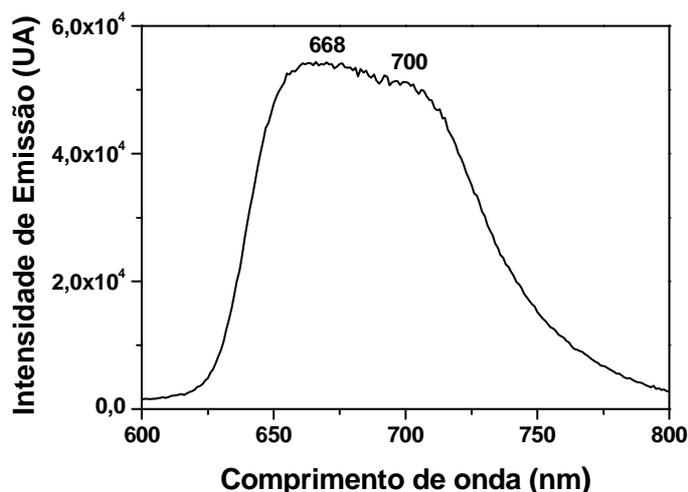


Figura 75: Espectro de emissão da TMPyP em solução aquosa ($2,4 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $\lambda_{exc} = 515$ nm).

O resultado de massa de TMPyP adsorvida demonstra que, mesmo sendo opostamente carregados, não houve uma adsorção efetiva da TMPyP no filme de DPPG, caracterizada pela significativa dessorção ocorrida. Nas primeiras imersões a TMPyP pode ter formado uma camada sobre a superfície lipídica e as demais moléculas de porfirina podem ter formado dímeros sobre esta camada, os quais foram removidos durante a imersão e lavagem mais longas. De acordo com a literatura, quando uma porfirina é dissolvida em água, o macrociclo pode formar dímeros não-covalentes ou grandes agregados em solução ou na superfície de moléculas de cargas opostas. (outros macrociclos, cianinas, polipeptídeos, proteínas, ácidos nucleicos ou componentes de membrana mitocondrial). Esta justificativa pode complementar a explicação para a dessorção observada, ou seja, a remoção de dímeros ou agregados durante a lavagem.⁴⁰

O espectro de emissão da Figura 75 é típico de porfirinas catiônicas em solventes polares. A baixa resolução é causada pelos grupos metil piridínio que criam um estado de transferência de carga muito próximo ao primeiro estado singlete excitado destas porfirinas, resultando em uma mistura de ambos os

estados. A proximidade destes estados é dependente da polaridade do solvente e do grau de rotação dos grupos metil piridínio.¹⁴¹ Na Figura 74, o espectro de emissão da TMPyP está bem resolvido e este fato pode ser atribuído a interação eletrostática entre a porfirina e o lipídio, que é responsável pela diminuição do grau de livre rotação dos grupos metil piridínio. Além disso, a TMPyP foi imobilizada no filme e este fato também pode ter ocasionado a diminuição da rotação e conseqüente aumento de resolução do espectro.

b) Filme LB composto por DMPA + DPPG + quitosana

Com relação ao filme formado por DMPA + DPPG + quitosana foi possível realizar um maior número de deposições de TMPyP, conforme pode ser visto na Tabela 1. A massa total de TMPyP incorporada neste filme foi 451 ng e a cinética de adsorção da TMPyP está ilustrada na Figura 76.

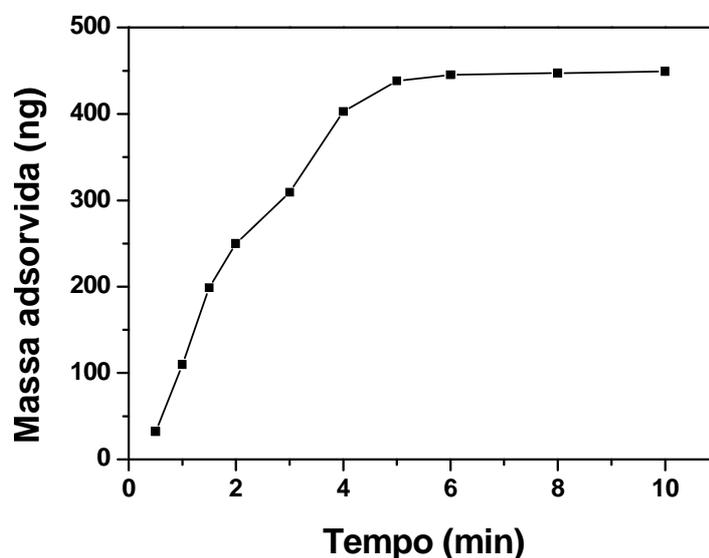


Figura 76: Cinética de adsorção da TMPyP ao filme de DPPG contendo quitosana.

Comparando a massa de TMPyP adsorvida nos filmes de DPPG na presença e na ausência de quitosana, observa-se que para o filme contendo quitosana, um

valor de massa seis vezes maior foi depositado, comparado àquele formado na ausência do polissacarídeo. A explicação para este fato é que a interação do tipo íon-dipolo entre a TMPyP e a quitosana é mais eficiente do que a interação eletrostática entre a porfirina e o lipídio. Desta maneira, a quitosana pode ser utilizada como um eficiente agente mediador e como um veículo carregador.

A presença da porfirina no filme LB contendo quitosana foi verificada através dos espectros de emissão realizados a cada intervalo de deposição (Figura 77).

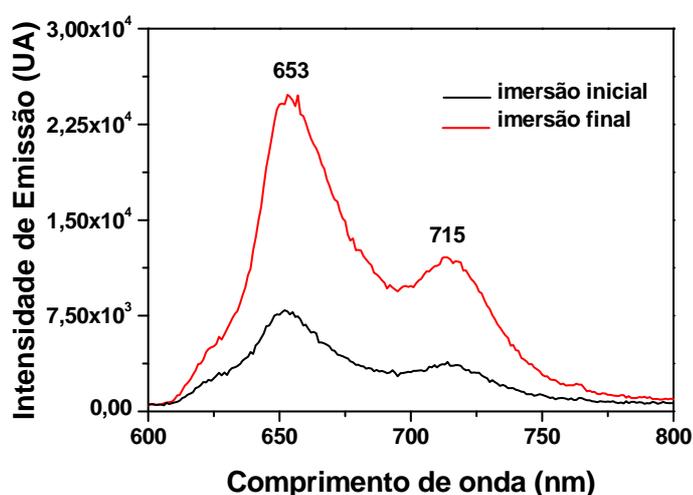


Figura 77: Espectros de emissão dos filmes LB de DMPA + DPPG + quitosana ($\lambda_{exc} = 515$ nm).

Estudos de interação de quitosana com monocamadas de DPPG, realizados através de elasticidade superficial, mostraram que o polissacarídeo apresenta elevada afinidade pelo lipídio na interface ar-água, mesmo não apresentando atividade superficial.¹⁴² Foi observado que a quitosana promove uma mudança local no empacotamento da monocamada lipídica, em um processo que envolve uma combinação de interações eletrostáticas, dipolares e hidrofóbicas. Conseqüentemente, a presença do polissacarídeo promove uma desestabilização da monocamada lipídica, podendo facilitar a penetração do fotossensibilizador na célula.

Por este motivo, concluímos que a quitosana pode ser empregada como um potencial agente carregador a ser utilizado em Terapia Fotodinâmica.

5. CONCLUSÕES

Para serem industrialmente relevantes, os processos precisam ser de baixo custo, operar continuamente e ter alta taxa de produção. O *spray dryer* desenvolvido pelo grupo é considerado de baixo custo, pois o gasto médio para se montar este equipamento é de R\$20.000,00. Um dos *spray dryers* mais empregado na literatura para testes realizados em escala laboratorial é o mini *spray dryer* da Büchi, modelo B-290, cujo preço atual é R\$150.000,00. Pudemos verificar que nosso equipamento custa 7,5 vezes menos do que este comercial. Além de ser de baixo custo, o equipamento desenvolvido neste trabalho foi eficientemente aplicado para a produção de nanopartículas poliméricas com morfologia esférica e para a encapsulação de porfirinas nestas matrizes. As partículas geradas no equipamento comercial são também de maior tamanho, escala de μm .

Na realização dos experimentos voltados ao desenvolvimento da configuração final do *spray dryer* a dextrina foi empregada como matriz polimérica. A escolha deste polissacarídeo foi fundamentada nos seguintes pré-requisitos: é economicamente viável, biocompatível, biodegradável e hidrofílica. O equipamento desenvolvido permitiu a produção de partículas de dextrina com, aproximadamente, 70% de produto seco, recuperado na membrana coletora. De acordo com os dados de TGA e DTA pudemos verificar que as condições do processo não afetaram as características estruturais da dextrina. Além disso, as imagens de MEV e MET comprovaram a aplicabilidade do equipamento desenvolvido para a produção de partículas esféricas com diâmetro médio estimado de 880 nm.

Nos experimentos para o desenvolvimento de uma metodologia de encapsulação a MnTPPS₄ e a TPPS₄ foram incorporadas em nanoesferas de dextrina com uma eficiência de encapsulação elevada (maior que 95%). As imagens

de MEV e MET confirmaram a produção de nanoesferas e o EDS indicou a presença de MnTPPS₄ nas partículas formadas. O diâmetro médio estimado das esferas contendo TPPS₄ é 920 nm e o intervalo de tamanho das partículas contendo MnTPPS₄ é 0,2 - 2,6 µm.

A aquisição do espectro de absorção da TPPS₄ a partir de medida de reflectância difusa comprovou a estabilidade estrutural do fotossensibilizador após o processo *spray drying*, uma vez que suas propriedades espectroscópicas não foram alteradas. A partir da análise por espectroscopia de fotoluminescência da TPPS₄ encapsulada em dextrina e presente nas misturas físicas com esse polímero, pudemos verificar que a encapsulação é responsável pela distribuição mais eficiente das moléculas de TPPS₄ nas nanoesferas, proporcionando um ambiente onde a porfirina pode ser mantida na sua forma monomérica e ocasionando emissões com maior intensidade.

Embora as encapsulações em dextrina tenham sido realizadas com sucesso e tenham contribuído para o estabelecimento de uma metodologia de encapsulação, não há relatos na literatura sobre a utilização deste polissacarídeo como agente encapsulante. Além disso, a dextrina é um polímero hidrofílico e esta propriedade inviabiliza sua aplicação como veículo carregador para liberação controlada de fármacos. Assim, passamos a utilizar a quitosana como matriz polimérica, que é solúvel somente em pH ácido (~4).

Iniciamos os estudos com quitosana preparando partículas apenas deste polissacarídeo e verificamos através das imagens de MEV que foram produzidas nanoesferas com diâmetro médio estimado de 460 nm. A análise da quitosana de partida e da quitosana nanoesférica por espectroscopia no infravermelho nos mostrou que as condições do processo *spray drying* não afetaram a integridade

estrutural do polímero, uma vez que ambos os espectros apresentaram as mesmas bandas características.

A encapsulação da TMPyP em nanoesferas de quitosana também foi realizada com sucesso, uma vez que obtivemos uma eficiência de encapsulação de 89%. Além disso, as nanoesferas produzidas apresentaram diâmetro médio estimado de 460 nm. A partir do espectro de absorção obtido pela medida de reflectância difusa pudemos verificar que o fotossensibilizador não sofreu alteração estrutural após o processo *spray drying*, pois suas propriedades espectroscópicas não foram alteradas.

Através do estudo do perfil de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana pudemos observar que cerca de 22% da TMPyP foram liberados na primeira hora. Esta liberação inicial foi atribuída à porfirina que não encapsulou, ou seja, que ficou localizada na superfície das partículas. A liberação *burst* foi seguida por uma liberação lenta de mais 30% em 24 horas, atingindo o máximo de liberação (52%) que permaneceu constante até o final do experimento (72 horas).

A análise dos dados de liberação através dos modelos matemáticos mencionados, mostrou que o mecanismo de liberação da TMPyP a partir das nanoesferas de quitosana é por difusão e que este segue uma cinética descrita pelo modelo de Higuchi. Este resultado está de acordo com a literatura, que menciona a liberação de drogas hidrossolúveis incorporadas em matrizes poliméricas principalmente por difusão.

A cito e fotocitotoxicidade das nanoesferas de quitosana, da TMPyP livre e da TMPyP incorporada em nanoesferas de quitosana foram avaliadas utilizando células neoplásicas da linhagem J774-A1. Os resultados de citotoxicidade indicaram que não há diferença estatística significativa entre o controle e os grupos analisados, ou

seja, as propriedades citotóxicas da TMPyP não foram ativadas. Observou-se também que as nanoesferas de quitosana vazias não apresentaram citotoxicidade significativa.

Através dos experimentos de fotocitotoxicidade conseguimos delinear o perfil do efeito dose-dependente sobre as células da linhagem J774-A1. Os resultados obtidos na avaliação da fotocitotoxicidade indicaram que o maior efeito fotodinâmico foi alcançado com PP10J e dose de irradiação de 10 J cm^{-2} , levando a uma morte celular de cerca de 25%. O efeito fotodinâmico obtido com a porfirina encapsulada na mesma concentração e com a mesma dose de irradiação foi, aproximadamente, 10% maior do que para a porfirina livre. É importante ressaltar que nos estudos de fotocitotoxicidade a TMPyP foi irradiada com luz de comprimento de onda igual a 650 nm e que esta porfirina apresenta fraca absorção nesta região. Mesmo assim, conseguimos uma morte celular de 25%.

O aumento do efeito fototóxico é um dos benefícios proporcionados pelos veículos carregadores em TFD e nosso resultado está de acordo com Konan e colaboradores, que relataram que todas as formulações de p-THFP incorporada nas nanopartículas apresentaram fototoxicidade maior do que a p-THFP livre e na mesma concentração. Roby e colaboradores e Vargas e colaboradores, também relataram que porfirinas encapsuladas exibem a atividade terapêutica maior do que as respectivas porfirinas livres.

Além de não apresentar citotoxicidade e aumentar o efeito fotodinâmico da TMPyP, pudemos constatar que a quitosana promoveu uma maior adsorção da TMPyP nos filmes de DPPG. A explicação para este fato é que a interação do tipo íon-dipolo entre a TMPyP e a quitosana é mais eficiente do que a interação eletrostática entre a porfirina e o lipídio. Além disso, a quitosana promove uma

mudança local no empacotamento da monocamada lipídica e sua presença promove uma desestabilização da monocamada lipídica, podendo facilitar a penetração do fotossensibilizador na célula.

Finalmente, gostaríamos de reforçar a importância de cada etapa para o encerramento deste trabalho. O desenvolvimento do equipamento foi um dos objetivos principais desta tese e este foi fundamental para a realização das demais etapas. A incorporação da TPPS₄ e da MnTPPS₄ em nanoesferas de dextrina forneceu experiência na metodologia de encapsulação para que iniciássemos os estudos com quitosana e TMPyP. As colaborações realizadas com outros grupos de pesquisa foram importantes para a validação da metodologia desenvolvida. Através dos estudos com células neoplásicas da linhagem J774-A1 comprovamos que a quitosana não apresenta citotoxicidade, a TMPyP é ativada somente sob irradiação e que a porfirina encapsulada apresenta atividade fotodinâmica maior do que a porfirina livre, sendo este aumento uma das finalidades de se empregar veículos carregadores em TFD. Os estudos de interação da TMPyP com monocamadas lipídicas foram importantes para suplementar os dados de cito e fotocitotoxicidade, sugerindo a quitosana como um potencial veículo carregador de fotossensibilizadores em TFD.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322, acessado em abril de 2008.
- ² http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=81, acessado em abril de 2008.
- ³ http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793, acessado em abril de 2008.
- ⁴http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_magnitude_cancerbrasil.pdf, acessado em abril de 2008.
- ⁵ http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=483, acessado em abril de 2008.
- ⁶ <http://www.mamainfo.org.br/texto.asp?c=hormonioterapia>, acessado em abril de 2008.
- ⁷http://www.roche.com.br/TherapeuticAreas/Oncologia/cancer+colorretal/tratamento/immunoterapia_PT.htm, acessado em abril de 2008.
- ⁸http://www.roche.com.br/TherapeuticAreas/Oncologia/linfoma/tratamento/radioterapia_PT.htm, acessado em abril de 2008.
- ⁹ http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101, acessado em abril de 2008.
- ¹⁰http://www.roche.com.br/TherapeuticAreas/Oncologia/linfoma/tratamento/quimioterapia_PT.htm?freetextitem1page=1, acessado em abril de 2008.
- ¹¹ Konan, Y. N.; Gurny, R.; Allémann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photoch. Photobio. B*, v. 66, p. 89-106, 2002.
- ¹² Roberts, D. J.; Cairnduff, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review, *Brit. J. Plast. Surg.*, v. 48, p. 360-70, 1995.
- ¹³ Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Brückner, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, v. 54, p. 4151-4202, 1998.
- ¹⁴ Raab, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria, *Zeitschrift fur Biologie*, v. 39, p. 524-546, 1900.

- ¹⁵ Triesscheijn, M.; Baas, P.; Schellens, J. H. M.; Stewart, F. A. Photodynamic therapy in oncology, *Oncologist.*, v. 11, p. 1034-1044, 2006.
- ¹⁶ Silva, A. R. **Preparação, caracterização e avaliação de nanoesferas de PLGA (50:50) contendo In(III)- meso-tetrafenilporfirina para aplicação em terapia fotodinâmica.** 2007. 177f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- ¹⁷ Uchoa-Fernandes, A. **Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina.** 2007. 227f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ¹⁸ <http://www.magicray.ru/RU/lecture/2.html>, acessado em agosto de 2008.
- ¹⁹ Pushpan, S. K.; Venkatraman, S.; Anand, V. G.; Sankar, J.; Parmeswaran, D.; Ganesan, S.; Chandrashekar, T. K. Porphyrins in photodynamic therapy - A search for Ideal photosensitizers, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, v. 2, p. 187-207, 2002.
- ²⁰ Roby, A.; Erdogan, S.; Torchilin, V. P. Solubilization of poorly soluble PDT agent, meso-tetraphenylporphin, in plain or immunotargeted PEG-PE micelles results in dramatically improved cancer cell killing in vitro, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 62, p. 235-240, 2006.
- ²¹ Fu, J.; Li, X. Y.; Ng, D. K. P.; Wu, C. Encapsulation of phthalocyanines in biodegradable poly(sebacic anhydride) nanoparticles, *Langmuir*, v. 18, p. 3843-3847, 2002.
- ²² Konan, Y. N.; Chevallier, J.; Gurny, R.; Allémann, E. Encapsulation of p-THPP into nanoparticles: cellular uptake, subcellular localization and effect of serum on photodynamic activity, *Photochem. Photobiol.*, v. 77, p. 638-644, 2003.
- ²³ Ricchelli, F.; Franchi, L.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Gobbo, S.; Nikolov, P.; Bommer, J. C.; Reddi, E. Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting, *Int. J. Biochem. Cell B.*, v. 37, p. 306-319, 2005.

- ²⁴ Borissevitch, I. E.; Tominaga, T. T.; Schmitt, C. C. Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics, *J. Photoch. Photobio. A*, v. 114, p. 201-207, 1998.
- ²⁵ Ohulchanskyy, T. Y.; Roy, I.; Goswami, L. N.; Chen, Y.; Bergey, E. J.; Pandey, R. K.; Oseroff, A. R.; Prasad, P. N. Organically modified silica nanoparticles with covalent incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer, *Nano Lett.*, v. 7, p. 2835-2842, 2007.
- ²⁶ Cole, C. D.; Liu, J. K.; Sheng, X.; Chin, S. S.; Schmidt, M. H.; Weiss, M. H.; Couldwell, W. T. Hypericin-mediated photodynamic therapy of pituitary tumors: preclinical study in a GH4C1 rat tumor model, *J. Neuro-oncol.*, v. 87, p. 255-261, 2008.
- ²⁷ Gomes, C. N. L. **Estudos sinérgicos de novos derivados de ftalocianina de zinco contendo grupamentos quelantes para íons cálcio aplicados na Terapia Fotodinâmica: avaliação fotofísica e fotobilógica.** 2004. 173f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- ²⁸ Tang, W.; Xu, H.; Park, E. J.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v. 369, p. 579-583, 2008.
- ²⁹ Simioni, A. R.; Vaccari, C.; Re, M. I.; Tedesco, A. C. PHBHV/PCL microspheres as biodegradable drug delivery systems (DDS) for photodynamic therapy (PDT), *J. Mater. Sci.*, v. 43, p. 580-584, 2008.
- ³⁰ Boisbrun, M.; Vanderesse, R.; Engrand, P.; Olié, A.; Hupont, S.; Regnouf-de-Vains J. B.; Frochot, C. Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins, *Tetrahedron*, v. 64, p. 3494-3504, 2008.
- ³¹ Ma, J.; Chen, J. Y.; Idowu, M.; Nyokong, T. Generation of singlet oxygen via the composites of water-soluble thiol-capped CdTe quantum dots-sulfonated aluminum phthalocyanines, *J. Phys. Chem. B*, v. 112, p. 4465-4469, 2008.

- ³² Conway, C. L.; Walker, I.; Bell, A.; Roberts, D. J. H.; Brown, S. B.; Vernon, D. I., *In vivo* and *in vitro* characterisation of a protoporphyrin IX–cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 7, 290–298, 2008.
- ³³ Sharonov, G. V.; Karmakova, T. A.; Kassies, R.; Pljutinskaya, A. D.; Grin, M. A.; Refregiers, M.; Yakubovskaya, R. I.; Mironov, A. F.; Maurizot, J. C.; Vigny, P.; Otto, C.; Feofanov, A. V. Cycloimide bacteriochlorin p derivatives: Photodynamic properties and cellular and tissue distribution, *Free Radical Bio. Med.*, v. 40, p. 407–419, 2006.
- ³⁴ Nyman, E. S.; Hynninen, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Photoch. Photobio. B.*, v. 73, p. 1–28, 2004.
- ³⁵ Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet. Oncol.*, v. 5, p. 497-508, 2004.
- ³⁶ Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N. Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development, *Quím. Nova*, v. 25, 801-807, 2002.
- ³⁷ Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 1, 1-21, 2002.
- ³⁸ Banfi, S.; Caruso, E.; Caprioli, S.; Mazzagatti, L.; Canti, G.; Ravizza, R.; Gariboldi, M.; Monti, E. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells, *Bioorg. Med. Chem.*, v. 12, p. 4853-4860, 2004.
- ³⁹ Vargas, A.; Pegaz, B.; Debefve, E.; Donan-Kouakou, Y.; Lange, N.; Ballini, J. P.; van den Berg, H.; Gurny, R.; Delie, F. Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an *in vivo* evaluation using chick embryos, *Int. J. Pharm.*, v. 286, p. 131-145, 2004.

- ⁴⁰ Synytsya, A.; Synytsya, A.; Blafkova, P.; Volka, K.; Král, V. Interaction of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphine with chitosan in aqueous solutions, *Spectrochim. Acta A*, v. 66, p. 225-235, 2007.
- ⁴¹ Aggarwal, L. P. F.; Borissevitch, I. E. On the dynamics of the TPPS₄ aggregation in aqueous solutions Successive formation of H and J aggregates, *Spectrochim. Acta A*, v. 63, p. 227-233, 2006.
- ⁴² Siboni, G.; Amit-Patito, I.; Weizman, E.; Waintraub-Porat, M.; Weitman, H.; Ehrenberg, B.; Malik, Z. Specificity of photosensitizer accumulation in undifferentiated versus differentiated colon carcinoma cells, *Cancer Lett*, v. 196, p. 57-64, 2003.
- ⁴³ Rubires, R.; Crusats, J.; El-Hachemi, Z.; Jaramillo, T.; López, M.; Valls, E.; Farrera, J. A.; Ribó, J. M. Self-assembly in water of the sodium salts of meso-sulfonatophenyl substituted porphyrins, *New J. Chem.*, v. 23, p. 189-198, 1999.
- ⁴⁴ Ribó, J. M.; Farrera, J. A.; Valero, M. L.; Virgili, A. Self-assembly of cyclodextrins with meso-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin in Aqueous Solution, *Tetrahedron*, v. 51, p. 3705-3712, 1995.
- ⁴⁵ Gandini, S. C. M.; Yushmanov, V. E.; Borissevitch, I. E.; Tabak, M. Interaction of the tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin with ionic surfactants: Aggregation and location in micelles, *Langmuir*, v. 15, p. 6233-6243, 1999.
- ⁴⁶ Wang, X. P.; Pan, J. H.; Shuang, S. M. Study on the supramolecular system of meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl), *Spectrochim. Acta A*, v. 57, p. 2755-2762, 2001.
- ⁴⁷ Winkelman, J.; Slater, G.; Grossman, J. The concentration in tumor and other tissues of parenterally administered tritium- and ¹⁴C-labeled tetraphenylporphinesulfonate, *Cancer Res.*, v. 27, p. 2060-2064, 1967.
- ⁴⁸ Winkelman, J. The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor-bearing rat, *Cancer Res.*, v. 22, p. 589-596, 1962.
- ⁴⁹ Gonçalves, P. J.; De Boni, L.; Barbosa Neto, N. M.; Rodrigues Jr., J. J.; Zílio, S. C.; Borissevitch, I. E. Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl) porphyrin, *Chem. Phys. Lett.*, v. 407, p. 236-241, 2005.

- ⁵⁰ Solban, N.; Rizvi, I.; Hasan, T. Targeted photodynamic therapy, *Laser. Surg. Med.*, v. 38, p. 522–531, 2006.
- ⁵¹ Via, L. V.; Magno, S. M. Photochemotherapy in the treatment of cancer, *Curr. Med. Chem.*, v. 8, p. 1405-1428, 2001.
- ⁵² Stylli, S. S.; Kaye, A. H. Photodynamic therapy of cerebral glioma – A review. Part I – A biological basis, *J. Clin. Neurosci.* v. 13, p. 615-625, 2006.
- ⁵³ Nepomuceno, M. F.; Tabak, M.; Vercesi, A. E. Opposite effects of Mn(III) and Fe(III) forms of meso-tetrakis(4-N-methyl pyridiniumyl) porphyrins on isolated rat liver mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, v. 34, p. 41-47, 2002.
- ⁵⁴ Inada, N. M.; da Silva, A. R.; Jorge, R. A.; Borecky, J.; Vercesi, A. E. Irradiated cationic mesoporphyrin induces larger damage to isolated rat liver mitochondria than the anionic form, *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 457, p. 217–224, 2007.
- ⁵⁵ Kessel, D.; Luo, Y. Mitochondrial photodamage and PDT induced apoptosis, *J. Photoch. Photobio. B.*, v. 42, p. 89–95, 1998.
- ⁵⁶ Kessel, D.; Luo, Y.; Deng, Y.; Chang, C. K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, v. 65, p. 422–426, 1997.
- ⁵⁷ http://biologiacesaresezar.editorasaraiva.com.br/navitacontent_/userFiles/File/Biologia_Cesar_Sezar/BIO1_139.jpg, acessado em agosto de 2008.
- ⁵⁸ <http://isiknowledge.com>, acessado em outubro de 2008.
- ⁵⁹ Luz, P. P.; Neri, C. R.; Serra, O. A. Dextrin-microencapsulated porphyrin. luminescent properties, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1130, p. 91-96, 2008.
- ⁶⁰ Pegaz, B.; Debeve, E.; Borle, F.; Ballini, J. P.; van der Bergh, H.; Kouakou-Konan, Y. N. Encapsulation of porphyrins and chlorins in biodegradable nanoparticles: The effect of dye lipophilicity on the extravasation and the photothrombic activity. A comparative study, *J. Photoch. Photobio. B.*, v. 80, p. 19-27, 2005.
- ⁶¹ Reddy, L. H. Drug delivery to tumours: recent strategies, *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 57, p. 1231-1242, 2005.

- ⁶² Bachor, R.; Shea, C. R.; Gillees, R.; Hasan, T. Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e₆-conjugated microspheres, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 1580-1584, 1991.
- ⁶³ van Nostrum, C. F. Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 56, p. 9-6, 2004.
- ⁶⁴ Gomes, A. J.; Lunardi, C. N.; Tedesco, A. C. Characterization of biodegradable poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) nanoparticles loaded with bacteriochlorophyll-a for photodynamic therapy, *Photomed. Laser Surg.*, v. 25, p. 428-435, 2007.
- ⁶⁵ Marchetti, J. M. **Memorial**. 2007. 318p. Concurso para docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- ⁶⁶ Ricci-Junior, E.; Marchetti, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use, *Int. J. Pharm.*, v. 310, p. 187-195, 2006.
- ⁶⁷ Allison, R. R.; Mota, H. C.; Bagnato, V. S.; Sibata, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy - State of the art review, *Photodiagn Photodyn. Ther.*, v. 5, 19-28, 2008.
- ⁶⁸ <http://www.ifi.unicamp.br/extensao/downloads/nanobiotecnologia.doc>, acessado em setembro de 2008.
- ⁶⁹ Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quim. Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.
- ⁷⁰ . Marcato, P. D; Duran, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 8, p. 2216-2229, 2008.
- ⁷¹ <http://www.nanoparticles.org/links/>, acessado em abril de 2007.
- ⁷² Ré, M. I. Microencapsulação: tecnologia que atribui propriedades inteligentes a materiais ativos, *Ciência Hoje*, v. 27, p. 24-29, 2000.
- ⁷³ Weiss, B.; Schneider, M.; Muys, L.; Taetz, S.; Neumann, D.; Schaefer, U. F.; Lehr, C. M. Coupling of biotin-(poly(ethylene glycol))amine to poly(D,L-lactide-co-glycolide)

nanoparticles for versatile surface modification, *Bioconjugate Chem.*, v. 18, p. 1087-1094, 2007.

⁷⁴<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P2191>, acessado em agosto de 2008.

⁷⁵http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=PartOfName&SearchString=dextrin, acessado em agosto de 2008.

⁷⁶ Desai, K. G. Properties of tableted high-amylose corn starch-pectin blend microparticles intended for controlled delivery of diclofenac sodium, *J. Biomater. Appl.*, v. 21, p. 217-233, 2007.

⁷⁷ Wan, W.K.; Yang, L.; Padavan, D.T. Use of degradable and nondegradable nanomaterials for controlled release, *Future Medicine - Nanomedicine*, v. 2, p. 483-509, 2007.

⁷⁸ Lehninger, A. L. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo: Sarvier, 1993, 725p.

⁷⁹ Constantino, M. G. **Química Orgânica - Curso Básico Universitário**, 1ª edição., Rio de Janeiro: LTC, 2008, v. 3, 574p.

⁸⁰ Braga, G. K.; Oliveira, W. P. Manufacturing drug loaded chitosan microspheres by spray drying: development, characterization, and potential use in dentistry, *Dry. Technol.*, v. 25, p. 303-310, 2007.

⁸¹ Hu, F. Q.; Ren, G. F.; Yuan, H.; Du, Y. Z.; Zeng, S. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel, *Colloid. Surface. B*, v. 50, p. 97-103, 2006.

⁸² Gupta, K. C.; Jabrail, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres, *Carbohydr. Polym.*, v. 66, p. 43-54, 2006.

⁸³ Signini, R.; Campana-Filho, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride, *Polym. Bull.*, v. 42, p. 159-166, 1999.

- ⁸⁴ Wu, Y.; Hisada, K.; Maeda, S.; Sasaki, T. ; Sakuri, K. Fabrication and structural characterization of the Langmuir-Blodgett films from a new chitosan derivative containing cinnamate chromophores, *Carbohydr. Polym.*, v. 68, p. 766-772, 2007.
- ⁸⁵ Wang, Y. S.; Liu, L. R.; Jiang, Q.; Zhang, Q. Q. Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified chitosan conjugate as a novel carrier of epirubicin, *Eur. Polym. J.*, v. 43, p. 43-51, 2007.
- ⁸⁶ Agnihotri, S. A.; Nadagouda, N. M.; Tejjraj, M. A. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release*, v. 100, p. 5-28, 2004.
- ⁸⁷ http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm, acessado em setembro de 2008.
- ⁸⁸ Ré, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying, *Dry. Technol.*, v. 24, p. 433-446, 2006.
- ⁸⁹ Parka, J. H.; MinsuLee, S. K.; Chunga, H.; Kimc, J. H.; Kimc, Y. S.; Parkc, R. W.; Kimc, I. S.; Seod, S. B.; Kwona, I. C.; Jeonga, S. Y. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumor activity, *Biomaterials*, v. 27, p. 119–126, 2006.
- ⁹⁰ Abram, A. P., **Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**, 1ª edição. Lima: Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú, 2004. 314p.
- ⁹¹ Liu, C.; Desai, K. G. H.; Tang, X.; Chen, X. Drug release kinetics of spray-dried chitosan microspheres, *Dry. Technol.*, v. 24, p. 769–776, 2007.
- ⁹² Loksuwan, J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin, *Food Hydrocolloid*, v. 21, p. 928–935, 2007.
- ⁹³ Xie, Y. L.; Zhou, H. M.; Zhang, Z. R. Effect of relative humidity on retention and stability of vitamin A microencapsulated by spray drying. *J. Food Biochem.*, v. 31 p. 68-80, 2007.

- ⁹⁴ Desai, K. G. H.; Park, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *J. Microencapsul.*, v. 22, p. 179-192, 2005.
- ⁹⁵ Hussain, M. R.; Maji, T. K. Preparation of genipin cross-linked chitosan-gelatin microcapsules for encapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) using salting-out method, *J. Microencapsul.*, v. 25, p. 414-420, 2008.
- ⁹⁶ Bilensoy, E.; Rkaynak, O. G.; Ertan, M.; Sen, M.; Hincal, A. A. Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel, *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 1519-1529, 2008.
- ⁹⁷ Aishwarya, S.; Mahalakshmi, S.; Sehgal, P. K. Collagen-coated polycaprolactone microparticles as a controlled drug delivery system, *J. Microencapsul.*, v. 25, p. 298-306, 2008.
- ⁹⁸ Jafari, S. M.; Assadpoor, E.; He, Y.; Bhandari, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying, *Dry. Technol.*, v. 26, p. 816-835, 2008.
- ⁹⁹ <http://www.sprayprocess.blogspot.com/>, acessado em setembro de 2008.
- ¹⁰⁰ Ré, M. I. Microencapsulation by spray drying, *Dry Technol.*, v. 16, p. 1195-1236, 1998.
- ¹⁰¹ <http://www.buchi.com> (Training Papers/Spray-drying), acessado em novembro de 2002.
- ¹⁰² Mujumdar, A. S., **Handbook of Industrial Drying**, 2ª edição. New York: Marcel Dekker, 1995, v.1, 742p.
- ¹⁰³ Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B. Ultrasonic atomisation into reduced pressure atmosphere-envisaging aseptic spray-drying for microencapsulation *J. Control. Release*, v. 95, p. 185-195, 2004.
- ¹⁰⁴ Kondo, A. **Microcapsule Processing and Technology**, New York: Dekker, 1979, 182p.
- ¹⁰⁵ Giunchedi, P., Conte, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug-delivery systems - An overview, *STP Pharma Sciences*, v. 5, p. 276-290, 1995.

- ¹⁰⁶ Okuyama, K., Lenggoro, I. W. Preparation of nanoparticles via spray route, *Chem. Eng. Sci.*, v. 58, p. 537-547, 2003.
- ¹⁰⁷ Luz, P. P.; Pires, A. M.; Serra, O. A. A low-cost ultrasonic spray dryer to produce spherical microparticles from polymeric matrices, *Quim. Nova*, v. 30, p. 1744-1746, 2007.
- ¹⁰⁸ ImageJ 1.38 com Java 1.6.0_02
- ¹⁰⁹ Herrmann, O.; Mehdi, S. H.; Corsini, A. Heterogeneous metal-insertion: a novel reaction with porphyrins, *Can. J. Chem.*, v. 56, p. 1084-1087, 1977.
- ¹¹⁰ Dos Santos Junior, D. S. **Filmes automontados e Langmuir Blodgett de compostos azoaromáticos**. 2005. 191f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Área de Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- ¹¹¹ Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- ¹¹² Vistica, D. T.; Skehan, P.; Scudiero, D.; Monks, A.; Pittman, A.; Boyd, M. R. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production, *Cancer Res.*, v. 51, p. 2515-2520, 1991.
- ¹¹³ Freshney, R. I. **Animal Cell Culture: A Practical Approach**, 1ª edição, Oxford: IRL Press, 1986, 248p.
- ¹¹⁴ <http://calazans.ccems.pt/cn/images/membrana2.jpg>, acessado em outubro de 2008.
- ¹¹⁵ Marsh, D. Lateral pressure in membranes, *BBA – Rev. Biomembrane*, v. 1286, p. 183-223, 1996.
- ¹¹⁶ Shaw, D. J.; Maar, J. H. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**, São Paulo: EDUSP, 1975, 185p.
- ¹¹⁷ Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solid and liquids. II Liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 39, p. 1848-1906, 1917.
- ¹¹⁸ Blodgett, K. B., Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 57, p. 1007-1022, 1935.

- ¹¹⁹ Blodgett, K. B.; Langmuir, I., Built-up films of barium stearate and their optical properties, *Phys. Rev.*, v. 51, p. 964-982, 1937.
- ¹²⁰ Segato, M. P.; Cavalheiro, E. T. G. J. Thermal analysis of ammonium, mono-, di- and triethanolammonium alginates, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*, v. 87, p. 737-741, 2007.
- ¹²¹ **Handbook of Chemistry and Physics**, 50^a edição. Cleveland: The Chemical Rubber Co, 1969-1970, p C-266.
- ¹²² Okuyama, K.; Lenggoro, I. W. Preparation of nanoparticles via spray route, *Chem. Eng. Sci.*, v. 58, p. 537-547, 2003.
- ¹²³ Lenggoro, I. W.; Hata, T.; Iskandar, F.; Lunden, M. M.; Okuyama, K. An experimental and modeling investigation of particles production by spray pyrolysis using a laminar flow aerosol reactor, *J. Mater. Res.*, v. 15, p. 733-742.
- ¹²⁴ Gouterman, M. Spectra of porphyrins, *J. Mol. Spectrosc.*, v. 6, p. 138-163, 1961.
- ¹²⁵ Gouterman, M.; Wagnière, G. H.; Snyder, L. C. Spectra of porphyrins part II. Four orbital model, *J. Mol. Spectrosc.*, v. 11, p. 108-127, 1963.
- ¹²⁶ Boucher, L. J. Manganese porphyrin complexes, *Coord. Chem. Rev.*, v. 7, p. 289-329, 1972.
- ¹²⁷ Anderson, H. L. Building molecular wires from the colours of life: conjugated porphyrin oligomers, *Chem. Commun.*, v. 23, p. 2323-2330, 1999.
- ¹²⁸ Quaglia, F.; De Rosa, G.; Granata, E.; Ungaro, F.; Fattal, E.; La Rotonda, M. I. Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying, *J. Control. Release*, v. 86, p. 267-278, 2003.
- ¹²⁹ <http://www.hemominas.mg.gov.br>, acessado em maio de 2007.
- ¹³⁰ Stryer, L., **Bioquímica**, 4^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 1002p.
- ¹³¹ Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A. N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M. D.; Gupta, A. A validated ¹H NMR method for the determination of

the degree of deacetylation of chitosan, *J. Pharmaceut. Biomed.*, v. 32, p. 1149-1158, 2003.

¹³² Ghaffari, A.; Navaee, K.; Oskoui, M.; Bayati, K.; Rafiee-Tehrani, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit[®] RS intended for sigmoidal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 67, p. 175-186, 2007.

¹³³ Reverchon, E.; Antonacci, A. Drug-polymer microparticles produced by supercritical assisted atomization, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 97, p. 1626-1637, 2007.

¹³⁴ Choudhari, S. K.; Kittur, A. A.; Kulkarni, S. S.; Kariduraganavar, M. Y. Development of novel blocked diisocyanate crosslinked chitosan membranes for pervaporation separation of water–isopropanol mixtures, *J. Membrane Sci.*, v. 302, p. 197-206, 2007.

¹³⁵ Ding, P.; Huang, K-L.; Li, G-Y.; Zeng, W-W. Mechanisms and kinetics of chelating reaction between novel chitosan derivatives and Zn(II), *J. Hazard. Mater.*, v. 146, p. 58-64, 2007.

¹³⁶ Desai, K. G. H.; Park, H. J. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying, *Drug Develop. Res.*, v. 64, p. 114-128, 2005.

¹³⁷ Gabrielli, D.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A. J.; Baptista, M. S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions *Photochem. Photobio.*, v. 79, p. 227-232, 2004.

¹³⁸ Almeida, R. D.; Manadas, B. J.; Carvalho, A. P.; Duarte, C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *BBA-Rev. Cancer*, v. 1704, p. 59-86, 2004.

¹³⁹ Castano, A. P.; Deminova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, v. 1, p. 279-293, 2004.

¹⁴⁰ Costa, P.; Lobo, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 13, p. 123-133, 2001.

¹⁴¹ Vergeldt, F. J.; Koehorst, R. B. M.; van Hoek, A.; Schaafsma, T. J. Intramolecular interactions in the ground and excited state of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins, *J. Phys. Chem.*, v. 99, p. 4397-4405, 1995.

¹⁴² Pavinatto, F. J.; Pavinatto, A.; Caseli, L.; Santos Jr., D. S.; Nobre, T. M.; Zaniquelli, M. E. D.; Oliveira Jr., O. N. Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface, *Biomacromolecules*, v. 8, p. 1633-1640, 2007.

ANEXO

Nosso grupo trabalha com duas linhas de pesquisa: Porfirinas e Terras Raras, atuando, principalmente, na síntese, caracterização e aplicação destes compostos. Assim, com o objetivo de verificar aplicabilidade do equipamento de *spray dryer* desenvolvido e baseado no grande interesse e importância para o grupo, um complexo de európio foi encapsulado em dextrina. Este trabalho resultou na publicação de um trabalho no *Journal of Fluorescence* que se encontra em anexo.

Europium Luminescent Polymeric Microspheres Fabricated by Spray Drying Process

Priscilla Paiva Luz · Ana Maria Pires ·
Osvaldo Antonio Serra

Received: 3 December 2007 / Accepted: 30 January 2008 / Published online: 22 February 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract The spray drying method was used to prepare luminescent microspheres. These microspheres were prepared by spraying an aqueous solution of dextrin and an europium(III) complex with subsequent drying in a hot medium. The spray dried powder was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and photoluminescence spectroscopy (PL). Particle size distribution was estimated from SEM images. The ultrasonic spray drying technique was successfully applied to yield a microparticulated and red luminescent powder composed by the $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ (dpa = dipicolinic acid) complex incorporated in dextrin microspheres.

Keywords Europium · Microspheres · Luminescence · Spray drying · Encapsulation

Introduction

Spray drying is by definition the transformation of a pumpable feed from a fluid state (solution, dispersion, or emulsion) into a dried particulate form by spraying the feed

into a hot drying medium [1, 2]. This technique involves evaporation from an atomized feed by mixing the spray and the drying medium. The complete process consists basically of a sequence of four steps: atomization, mixing of spray and air, evaporation, and product separation [3–7].

During the atomization step, the feed is splitted in many microdroplets. As a result, the surface area of the liquid is large and promotes an efficient heat exchange [7]. So, solvent evaporation is rapid and the temperature of the droplets can be kept far below the drying air temperature. For this reason, spray drying can be applied in both heat resistant and heat sensitive materials [8].

Selection of the atomizer is one of the most important choices in spray dryer design and has significant effect upon the size distribution of the final dried particles. The most important atomizer characteristics from the standpoint of product quality are uniformity of drop size, control of drop size distribution, and spray homogeneity. Common forms of atomizers are pressure atomizers, centrifugal (wheel) atomizers, and pneumatic (two-fluid) atomizers [4, 8, 9]. However, a novel spray drying technique consisting of feeding a fluid through an ultrasonic atomizer has been developed, which leads to smaller particle size [6, 9–12].

Although most often considered a dehydration process successfully employed for the drying of solutions, slurries, and pastes, spray drying is an important and widely used technology in many research and industrial fields. Spray drying can also be used as an encapsulation method once it entraps the “active” material within a protective matrix that is essentially inert to the material being encapsulated [3, 13]. Microencapsulation is a technique in which a membrane, usually a polymer, encloses small particles of solid, liquid or volatile compounds with the objective of offering protection to the core material from adverse environmental conditions such as undesirable effects of light, moisture and

P. P. Luz · O. A. Serra
Department of Chemistry, FFCLRP, University of São Paulo,
Ribeirão Preto, SP, Brazil

A. M. Pires
Department of Physics, Chemistry and Biology,
FCT-UNESP,
Presidente Prudente, SP, Brazil

O. A. Serra (✉)
Department of Chemistry, Rare Earth Laboratory,
University of São Paulo,
Av. Bandeirantes, 3900,
14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil
e-mail: osaserra@usp.br

oxygen, thus contributing to an increase in the shelf life of the product [14, 15].

Common polymers for these encapsulation processes include carbohydrates, gums and cellulose esters and ethers [16]. In particular, polysaccharide-based microparticles have gained much more attention in developing micro-particulated systems because of their flexibility to obtain a desirable drug release profile, cost-effectiveness and broad regulatory acceptance [17].

Red emitters are widely studied, especially those bearing the Eu^{3+} ion as activator. To be applied as a red phosphor, a material must have a high color purity (CIE x coordinate [18] higher than 0.65), besides an acceptable quantum efficiency. For Eu^{3+} -activated compounds, this is possible when the red emissions (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ at ~ 610 nm) are predominant over the orange emissions (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ at ~ 590 nm).

The narrow emission bands of rare earth ions arise from weakly allowed $f-f$ emissive transitions that are parity forbidden and well shielded from the local environment by $5s^2$ and $5p^6$ electrons [19]. In addition, lanthanides in aqueous solution are known to be either non-fluorescent or weakly fluorescent due to their low molar absorptivities and poor quantum yields. It happens also due to the non-radiative relaxation of Ln^{3+} ion through coupling with OH vibrational modes from solvent molecules [20].

The spectral distribution is a consequence of the symmetry around the Eu^{3+} ions, and different host lattices lead to different spectral distributions [21]. The intense interest in the photophysical properties of lanthanide ion complexes has been stimulated strongly by Lehn [22], who proposed that such complexes could be considered as light conversion molecular devices (LCMDs) and suggested the term “antenna effect”. This effect denotes a sequence of absorption, energy transfer, and emission phenomena involving distinct absorbing (the ligand) and emitting (the lanthanide ion) components, thus overcoming the very small absorption coefficients of the lanthanide ions [23–25].

In the majority of the systems studied, the excited singlet state of the ligand undergoes fast intersystem crossing (ISC) to the triplet state enhanced by the increased spin-orbit (LS) coupling induced by the heavy lanthanide ion. It is widely believed that it is from this triplet state that energy transfer occurs to the lanthanide ion through either a Dexter or a Förster mechanism [26].

Among the many types of complexes studied, the family of $[\text{Ln}(\text{dpa})_3]^{3-}$ is of particular interest because it fully satisfies the most frequent eight- and nine-coordination of Ln^{3+} [26]. Dipicolinates form a salt class of isomeric carboxylic acids containing heterocyclic nitrogen atom and two carboxylate groups that can coordinate the lanthanide cations [27]. This is in contrast to the β -diketone ligands that are commonly used to chelate Ln^{3+} and usually require an additional “neutral” ligand to obtain full coordination [26, 28].

Therefore, this work reports an efficient method to produce $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ complex encapsulated in dextrin microspheres by spray drying process, with a very intense red emission.

Experimental

Synthesis of europium dipicolinate complex $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$

Eu^{3+} chloride solution was prepared by dissolution of Eu_2O_3 (99.99%—Rhône-Poulenc/Rhodia®) in concentrated chlorhydric acid. $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ was prepared by dissolving EuCl_3 (5.0 μmol) and 2,6-dpa (15.0 μmol) in 40.0 ml of water. The pH was adjusted to approximately 6 with diluted NH_4OH (Fig. 1) [29].

Fabrication of luminescent microspheres

To the complex solution, 200 mg of dextrin (ACROS®) was added and the final volume was completed to 50.0 mL with water. Later, the solution was heated at 70 °C and stirred for 1 h. The final solution was stirred at room temperature for 23 h.

The microencapsulation process was made by using the spray dryer built in our laboratory [30]. In this process, microdroplets from feed solution were produced through an ultrasonic atomizer (Vigo Ar®) and were dried inside a tubular vertical furnace (EDG®). The inlet and outlet temperatures (280 and 275 °C, respectively) for the drying chamber were chosen according to the polymer thermal features. A cellulose membrane (Millipore®) owing a 0.025- μm micropore diameter supported on a sintered plate filter was used in order to collect the particles. A vacuum pump (Heidolph®) was used to separate the dried material from the air, and a filter flask placed inside a vessel containing cold water was used to hold the condensed water vapor.

Microspheres characterization

Morphological

Dextrin- $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ microspheres prepared by spray drying were morphologically characterized by SEM on a Zeiss® EVO 50 microscope (EHT=15 kV). To acquire the

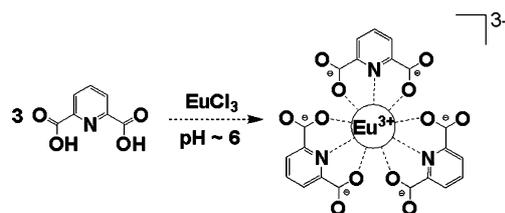


Fig. 1 Synthesis representation of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$

SEM images, the powder was dispersed in chloroform under ultrasound stirring, supported on an aluminum stub, and then coated by a gold thin layer using a sputtering system (Bal-Tec SCD-050) after drying. Diameter size distribution of particles was estimated from SEM images.

Spectroscopical

Emission and excitation spectra of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ dextrin microspheres were recorded on a SPEX TRIAX 550 FLUOROLOG III spectrofluorometer. Emission spectra were corrected for the wavelength dependence of the detection system sensitivity by using a correction curve supplied by the equipment software. Excitation spectra were correct dividing the obtained spectrum by the lamp one that was generated simultaneously from an internal reference. The luminescence lifetime measurements were acquired using a SPEX 1934D phosphorimeter equipped with a pulsed xenon lamp as an excitation source. A reference solution of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$, prepared as described in the experimental section, was also analyzed by luminescence spectroscopy.

Results and discussion

Fabrication of luminescent microspheres

In the present work, we produced red luminescent microspheres composed by $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ loaded in dextrin. The dried powder was collected over the membrane as shown in Fig. 2.

Microspheres characterization

Morphological

The morphology of the $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ incorporated in dextrin microparticles were examined by SEM (Fig. 3).

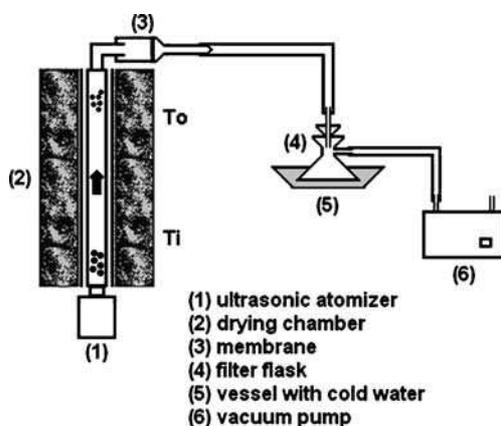


Fig. 2 Illustrative scheme of the co-current ultrasound spray drying system built in our laboratory [30]

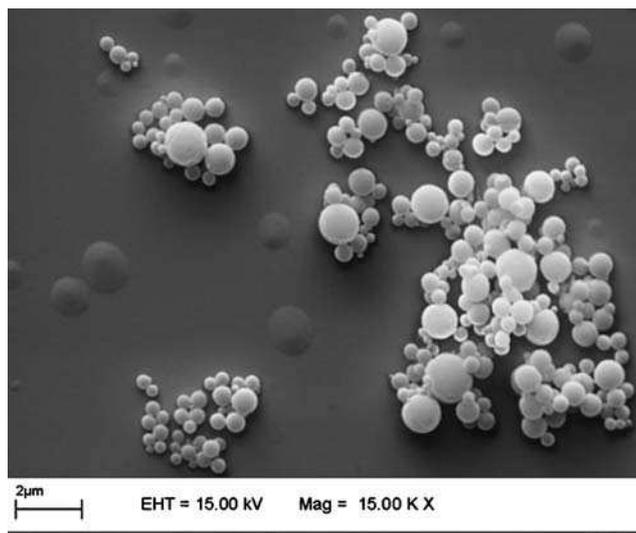


Fig. 3 SEM image of the $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ incorporated in dextrin microspheres using the developed ultrasonic spray drying technique

The SEM image reveals that the prepared particles have spherical shape with a smooth surface. Diameter size distribution of particles was estimated from SEM images [31]. In the total, a thousand particles were analyzed and the average diameter was estimated to be $0.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

Luminescence

The $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ reference solution and the $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ complex encapsulated in dextrin microspheres, powder form, were analyzed by luminescence spectroscopy (Figs. 4 and 5, respectively).

In agreement with the discussion presented in the introduction, the recorded spectra for the reference solution, Fig. 4, evidence that Eu^{3+} emits via ligand excitation at the $\pi \rightarrow \pi^*$ absorption maximum (280 nm) followed by energy intramolecular transfer to the Eu^{3+} excited levels, thus enhancing the red emission. In addition, the strength of the luminescent signal is orders of magnitude stronger than that observed for direct excitation (395 nm) of the Eu^{3+} ion (Fig. 4). Moreover, the comparison between the $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ luminescence spectra before, Fig. 4, and after microspheres loading, Fig. 5, ensured that the spray drying process does not change the structure of the complex. It is important to emphasize that the $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ complex encapsulated in dextrin microspheres spectra, Fig. 5, were recorded at 77 K in order to minimize vibronic influences and increase spectral resolution, although the luminescent property of this powder at room temperature is so high as at 77 K.

It has been well established that at pH 6–7 the complexation is complete and the Eu^{3+} coordination sphere is made by six oxygen atoms forming a trigonal prism with three nitrogen atoms capping the faces and in a plane normal to the C_3 axis

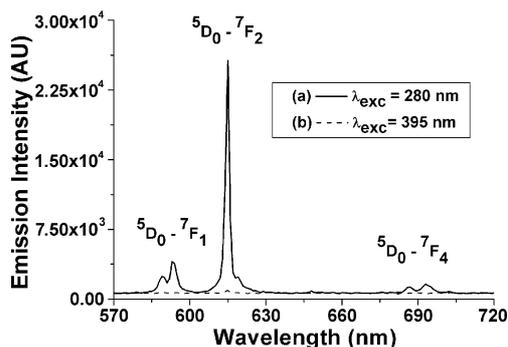


Fig. 4 Eu^{3+} emission spectra at room temperature of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ ($10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) reference solution with excitation at (a) ligand $\pi \rightarrow \pi^*$ absorption (280 nm) and (b) ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$ Eu^{3+} transition (395 nm)

[32]. The symmetry of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ is D_3 , allowing 0, 2, 1 and 3 lines for the ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0, 1, 2, 4$ transitions, respectively [29]. From the evaluation of the set of the ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_{0-4}$ transitions of Eu^{3+} , shown in the emission spectra of Figs. 4 and 5, it is possible to confirm that in the synthesized complex the activator ion occupies a D_3 high symmetry site.

We also analyzed the ${}^5\text{D}_0$ emission lifetime of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ aqueous solution and microencapsulated (Fig. 6). These lifetimes were estimated by first order decay fittings (Origin[®]) and are 1.75 and 1.66 ms, respectively. Our results agree with the literature, that

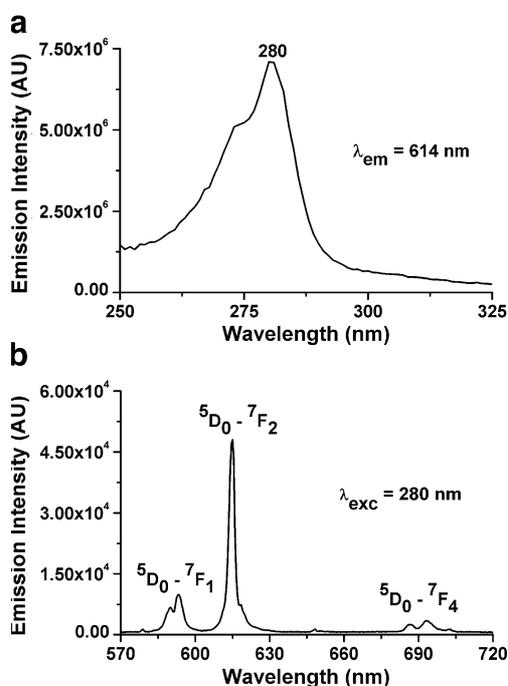


Fig. 5 Luminescent spectra at 77 K of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ encapsulated in dextrin microspheres: **a** excitation spectrum with emission fixed at the ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ Eu^{3+} maximum transition (614 nm). **b** Emission spectrum upon ligand $\pi \rightarrow \pi^*$ excitation (280 nm)

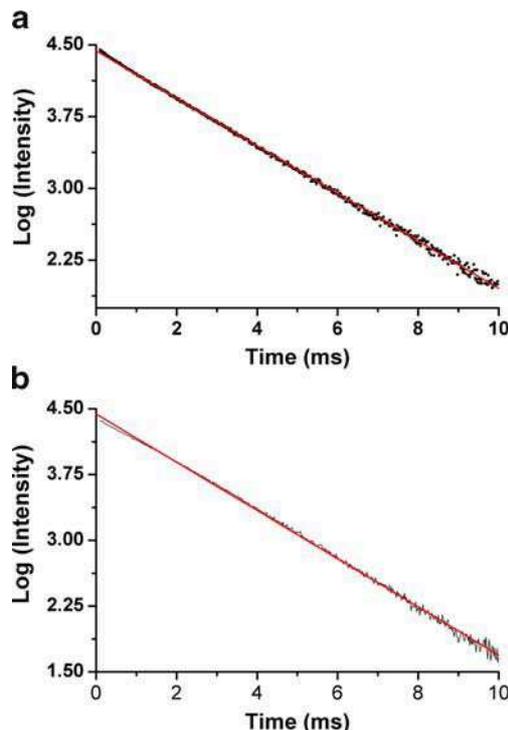


Fig. 6 Emission lifetimes of ${}^5\text{D}_0$ level of $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ **a** aqueous solution and **b** microencapsulated

reports a ${}^5\text{D}_0$ emission lifetime of 1.71 ms for $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ aqueous solution [26]. As the experimental decay curve of the ${}^5\text{D}_0$ level of Eu^{3+} could be fitted by a single exponential decay curve, it is possible to suggest that the activator center occupies a single or very similar symmetry sites even when the Eu-complex is encapsulated [33].

The excited state quantum efficiency was calculated from the emission spectra and from the luminescence lifetimes [34, 35]. We used the following equation to obtain the ${}^5\text{D}_0$ quantum efficiency:

$$\phi = A_r / (A_r + A_{nr}) \quad (1)$$

where ϕ is the excited state quantum efficiency, and A_r and A_{nr} are ${}^5\text{D}_0$ the radiative and non-radiative decay rates, respectively.

If we consider,

$$\tau^{-1} = A_r + A_{nr} \quad (2)$$

where τ is the ${}^5\text{D}_0$ emission lifetime, the Eq. 1 becomes,

$$\phi = A_r \cdot \tau \quad (3)$$

The A_r value was obtained by summing all the A_{0J} radiative rates for each ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ transition ($A_r = \sum A_{0J}$). In

the case of Eu^{3+} , $A_r = A_{01} + A_{02} + A_{03} + A_{04}$, which is related to the ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ transitions ($0 \leq J \leq 4$).

$$A_r = \frac{A_{01}E_{01}}{S_{01}} \left(\sum_{J=1}^4 \frac{S_{0J}}{E_{0J}} \right) \quad (4)$$

where E_{0J} (cm^{-1}) is the average transition energy and S_{0J} is the integrated intensity of the emission transition. Moreover, it is well known that the nature of magnetic-dipole transitions is independent of the crystal field surrounding the metal ion. So, the radiative rate of A_{01} is estimated to be 50 s^{-1} [34, 35].

From Eq. 3 and the previous calculated emission lifetime, we were able to obtain the ${}^5\text{D}_0$ quantum efficiencies. According to the calculus, the quantum efficiencies are 50% and 37.4% for $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ aqueous solution and microencapsulated, respectively.

The predominance of the ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ transition displayed by $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ encapsulated in dextrin microspheres results in the red emission, whose CIE chromaticity coordinates ($x=0.68$ and $y=0.31$) attend perfectly the requirement for the red standard ($x>0.65$) [18].

Conclusion

First of all, we have succeeded in encapsulating a well-known europium coordination complex in a polymeric matrix by ultrasound spray drying, resulting in luminescent microspheres. The recorded spectra evidenced that Eu^{3+} ions emit via ligand excitation at the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition (280 nm) followed by an energy intramolecular transfer to the Eu^{3+} excited levels, thus enhancing the red emission (antenna effect). In addition, the intensity of the luminescent signal is orders of magnitude stronger than that observed for direct excitation of the Eu^{3+} ion.

The comparison between $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ luminescence spectra before and after the microspheres loading ensured that the spray drying process does not change the structure of the complex. $[\text{Eu}(\text{dpa})_3]^{3-}$ -loaded dextrin emission lifetime and quantum efficiency were only slightly lower. The microencapsulation process enables the formation of a protective matrix around the encapsulated material. In this sense, we have applied the ultrasonic spray drying encapsulation technique to protect the complex from factors that might cause its deterioration, thereby extending the phosphor shelf time and making it easy to manipulate.

Acknowledgements The authors gratefully thank Dr R. F. Silva for helpful discussions and FAPESP for financial support and scholarships.

References

- Loksuwan J (2007) Characteristics of microencapsulated b-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocoll* 21(5–6):928–935
- Braga GK, Oliveira WP (2007) Manufacturing drug loaded chitosan microspheres by spray drying: development, characterization, and potential use in dentistry. *Dry Technol* 25(2):303–310
- Ré MI (1998) Microencapsulation by spray drying. *Dry Technol* 16(6):1195–1236
- Mujumdar AS (1995) *Handbook of industrial drying*. Marcel Dekker, New York
- www.buchi.com, accessed on May 2007
- Freitas S, Merkle HP, Gander B (2004) Ultrasonic atomisation into reduced pressure atmosphere-envisaging aseptic spray-drying for microencapsulation. *J Control Release* 95(2):185–195
- Asaji K (1979) *Microcapsule processing and technology*. Marcel Dekker, New York
- Giunchedi P, Conte U (1995) Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview. *S. T.P. Pharma Sci* 5(4):276–290
- Okuyama K, Lenggoro IW (2003) Preparation of nanoparticles via spray route. *Chem Eng Sci* 58(3–6):537–547
- Avvaru B, Patil MN, Gogate PR, Pandit AB (2006) Ultrasonic atomization: effect of liquid phase properties. *Ultrasonics* 44(2):146–158
- Suh WH, Suslick KS (2005) Magnetic and porous nanospheres from ultrasonic spray pyrolysis. *J Am Chem Soc* 127(34):12007–12010
- Abdullah M, Iskandar F, Shibamoto S, Ogi T, Okuyama K (2004) Preparation of oxide particles with ordered macropores by colloidal templating and spray pyrolysis. *Acta Mater* 52(17):5151–5156
- Ré MI (2006) Formulating drug delivery systems by spray drying. *Dry Technol* 24(4):433–446
- Xie Y-L, Zhou H-M, Zhang Z-R (2007) Effect of relative humidity on retention and stability of vitamin A microencapsulated by spray drying. *J Food Biochem* 31(1):68–80
- Desai KGH, Park HJ (2005) Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *J Microencapsul* 22(2):179–192
- Chiou D, Langrish TAG (2007) Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. *J Food Eng* 82(1):84–91
- Desai KG (2007) Properties of tableted high-amylose corn starch-pectin blend microparticles intended for controlled delivery of diclofenac sodium. *J Biomater Appl* 21(3):217–233
- Santa-Cruz PA, Teles FS. *Spectra Lux Software v.2.0*, Ponto Quântico 2003, Nanodispositivos/RENAMI.
- Moynihan S, Lacopino D, O'Carroll D, Doyle H, Tanner DA, Redmond G (2007) Emission colour tuning in semiconducting polymer nanotubes by energy transfer to organo-lanthanide dopants. *Adv Mater* 19(18):2474–2479
- Panigrahi BS (2002) A fluorimetric study of terbium, europium and dysprosium in aqueous solution using pyridine carboxylic acids as ligands. *J Alloys Compd* 334(1–2):228–231
- Porcher P (1999) In: Saez R, Caro PA (eds) *Rare earths*. Editorial Complutense, Madrid
- Lehn JM (1990) Perspectives in supramolecular chemistry—from molecular recognition towards molecular information processing and self-organization. *Angew Chem Int Ed* 29(11):1304–1319
- Zhao B, Chen X-Y, Cheng P, Liao D-Z, Yan S-P, Jiang Z-H (2004) Coordination polymers containing 1D channels as selective luminescent probes. *J Am Chem Soc* 126(47):15394–15395
- Cicillini SA, Calefi PC, Neri CR, Nassar EJ, Serra OA (1999) Use of polymeric resin in the formation of SiO_2 hybrid gels. *J Non-Cryst Solids* 247(1–3):114–119

25. DeOliveira E, Neri CR, Serra OA, Prado AGS (2007) Antenna effect in highly luminescent Eu^{3+} anchored in hexagonal mesoporous silica. *Chem Mater* 19(22):5437–5442
26. George MR, Golden CA, Gossel MC, Curry RJ (2006) Modified dipicolinic acid ligands for sensitization of europium(III) luminescence. *Inorg Chem* 45(4):1739–1744
27. Puntus LN, Zolin VF, Babushkina TA, Kutuza IB (2004) Luminescence properties of isomeric and tautomeric lanthanide pyridinedicarboxylates. *J Alloy Compd* 380(1–2):310–314
28. Binnemans K (2005) *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*. Elsevier, Amsterdam
29. Fernandes A, Jaud J, Dexpert-Ghys J, Brouca-Cabarrecq C (2001) Study of new lanthanide complexes of 2,6-pyridinedicarboxylate: synthesis, crystal structure of $\text{Ln}(\text{Hdipic})(\text{dipic})$ with $\text{Ln} = \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Ho}, \text{Er}, \text{Yb}$, luminescence properties of $\text{Eu}(\text{Hdipic})(\text{dipic})$. *Polyhedron* 20(18):2385–2391
30. Luz PP, Pires AM, Serra OA (2007) A low-cost ultrasonic spray dryer to produce spherical microparticles from polymeric matrices. *Quim Nova* 30(7):1744–1746
31. ImageJ 1.38 bundled with Java 1.6.0_02.
32. Gmelin L (1980) *Gmelin Handbuch der Anorganischen Chemie—Sc, Y, La–Lu rare earth elements (Part D1—coordination compounds)*. Springer, Berlin
33. Blasse G, Grambmaier BC (1994) *Luminescent materials*. Springer, Berlin
34. de Mello Donegá C, Alves Júnior S, de Sá GF (1997) Synthesis, luminescence and quantum yields of $\text{Eu}(\text{III})$ mixed complexes with 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione and 1,10-phenanthroline-N-oxide. *J Alloys Compd* 250(1–2):422–426
35. Kodaira CA, Brito HF, Malta OL, Serra OA (2001) Luminescence and energy transfer of the europium (III) tungstate obtained via the Pechini method. *J Lumin* 101(1–2):11–21

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](#)