



AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE ESTRATÉGIAS DE CONJUGAÇÃO DO TOCILIZUMAB EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIOCOMPATÍVEIS

Pedro Ivo Tonini Risolia Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Ariane de Jesus Sousa Batista

Rio de Janeiro
Março de 2024

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO ENTRE
TOCILIZUMAB E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIOCAMPATÍVEIS

Pedro Ivo Tonini Risolia Barbosa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz

Ariane de Jesus Sousa Batista

Aprovada por: Helen Conceição Ferraz

Ariane Sousa Batista

João Victor Nicolini

Flávia Almada do Carmo

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2024

Barbosa, Pedro Ivo Tonini Risolia

Análise comparativa de métodos de conjugação entre o Tocilizumab e Nanopartículas poliméricas biocompatíveis / Pedro Ivo Tonini Risolia Barbosa. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2024.

xix, 83 p.; il.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Ariane de Jesus Sousa Batista

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2023.

Referências bibliográficas: p. 71-83.

1. Artrite reumatóide. 2. Assunto. 3. Assunto. I. Ferraz,

Helen

Conceição *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Civil. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Teresa, por me ensinarem o valor do esforço e da Educação e por todo o apoio que me deram durante a vida toda. Desde o nascimento, me estimularam a descobrir meus objetivos de vida e ambições e me deram todo o suporte necessário para que eu os conseguisse atingir. Sem vocês, isso jamais teria sido possível. Obrigado por toda a criação, amor, carinho, broncas e puxões de orelha. Sem vocês, jamais seria quem sou hoje. Não tenho palavras para descrever a imensidão da gratidão que tenho por todos os atos, gestos, e esforços durante toda a minha vida. Amo vocês!

Ao Choquito, que me permite pegá-lo no colo, abraçá-lo, mesmo ficando levemente desconfortável. Por todas as noites que preferiu dormir no chão duro, debaixo dos meus pés, me fazendo companhia enquanto estudava, lia artigos e escrevia esta dissertação. Pelas tardes de longos passeios, que me ajudaram a espairecer, após horas e horas no laboratório. Pelas lambidas, cutucadas com o focinho gelado e suspiros ao meu lado. Por todas as vezes que me recebeu em casa, com as orelhas para trás e o rabo abanando. Te amo, neném.

A minha prima-irmã, Carolina, por quem sinto um carinho enorme, me faz companhia, joga conversas foras, escuta minhas lamúrias, manda reels, ajuda com o Choquito e é uma ótima *roommate*. Simplesmente, minha vida não seria a mesma sem você. Espero que façamos incontáveis viagens juntos.

Ao Fidel, pela amizade de mais de uma década. Por todas as vezes que me ajudou a rir e sorrir, mesmo quando eu estava atolado de coisas do mestrado para fazer. Por todas as vezes que me ouviu, me aconselhou ou até mesmo me deu esporro, quando necessário. Por todos os passeios, risadas, sustos com buzina, cabeçadas com capacete, cafés, longos podcasts sobre psicologia e pelos jogos (até os que você afunda (todos), seu cone horroroso). Poderia escrever horas sobre você e sua importância em todos os âmbitos da minha vida. Te amo, amigo!

Ao João, Thalita, e Thiago, por ouvirem minhas lamúrias, reclamações e vibrarem comigo minhas conquistas e vitórias. Por me distraírem quando era necessário e me ajudarem a sair de momentos de crise. Vocês tornam a vida mais leve e mais fácil, me ajudando em diversas etapas e setores dela. Obrigado por todos os anos de amizade. Vocês são essenciais para mim.

Ao Abner, André, Pietro, Renan, e William, vocês são incríveis. Uma pena que o fim da graduação tenha aumentado a distância física entre alguns de nós, porém a afetiva é de proximidade. Amo vocês e obrigado por tudo!

À Victória, que além de me proporcionar uma amizade maravilhosa durante todos os anos de graduação e pós-graduação, deixou o período pandêmico um pouco mais tolerável com as jogatinas, e pela imensa ajuda durante o mestrado. Você é incrível, obrigado por tudo.

Aos meus amigos Bruna, Cláudio, Caio, Elena, Giulia, Thatiana, Leonardo, Bitto, Lilian, Rogério, Mayara, Gabriela, e Nadine por toda a camaradagem, risadas juntas, reclamações escutadas, apoio, e dividirem comigo suas ambições, projetos e objetivos. Fundamentais por todo o caminho percorrido.

À Viviane, por me ajudar a ser a melhor versão de mim mesmo, em todas as diferentes seções da minha vida. Obrigado por tudo. Desejo tudo de bom para você.

À Gabrielle, por mais que tenhamos tomados caminhos distintos, me apoiou durante nesta jornada e acreditou em mim quando ninguém mais, nem eu mesmo acreditava que conseguiria superar esse desafio que é o PEQ. Obrigado por tudo até aqui.

Aos amigos que a COPPE me proporcionou, Ruan, Paulo, Kathiane, Christian, Gabriele, Amanda, Moisés, Eliana, Felipe, Luka, Caio, Leonan e Bia. Por todos os dias que estudamos juntos, trocamos informações, listas, desabafos pré e pós aulas, provas, seminários, e conversas pelos corredores durante os cafés tomados.

Às minhas orientadoras, Helen, Ariane e Leda, pela orientação, incentivo, explicações, dedicação, oportunidade e paciência.

À Gabriela Mattos, pelos dias investidos em me ajudar no início do mestrado, por todas as vezes que dividiu seu conhecimento e experiência comigo e me ajudou durante essa jornada.

Ao Túlio e à Renata, por toda a paciência e ajuda com reagentes e equipamentos compartilhados durante o mestrado e todo o conhecimento, conversas, cervejas e risadas divididos durante minha passagem no LECC.

Ao Alexandre e Matheus, por toda a ajuda, conhecimento, risadas, desabafos, ajudas, congressos, cervejas, carnes, e também pela orientação durante todos os anos de iniciação científica no LECC, além de orientadores, foram grandes amigos. Desejo muito sucesso a vocês.

Ao Márcio, meu psicólogo, que é um profissional excepcional, por ter me ajudado a me tornar quem sou hoje, contribuindo de forma excepcional em todos os âmbitos da minha vida, inclusive para produção dessa dissertação.

A todos os professores que tiveram paciência para me passar conhecimentos, técnicas, e valores profissionais, contribuindo para minha formação. Em especial Leila, Lena, Sônia, Marcelão, Fabiano, Fábio, Faber, Marcus, Carsten, e Débora Way.

Ao presidente Lula, por voltar a valorizar o desenvolvimento da ciência, tecnologia e inovação no Brasil, país que tanto amo, nos ajudando a sair da crise desses tempos terríveis pelos quais passamos.

Ao Laboratório de Engenharia em Polímeros (EngePol) e ao Laboratório de Engenharia em Fenômenos Interfaciais (LABEFIT), por permitirem que a etapa experimental deste projeto tomasse vida; por todo o conhecimento produzido, conversas, auxílio em experimentos e análises; e pela saudável convivência acadêmica.

Ao Laboratório de Engenharia em Cultivos Celulares (LECC), ao Laboratório de Biotecnologia e Bioengenharia Estrutural (LABGENEST), e ao Laboratório de Apoio Instrumental 1 (LAPIN1), pelo fundamental apoio técnico.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, que proporcionou participações em importantes eventos científicos e o aprofundamento do conhecimento nos temas desta pesquisa.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE ESTRATÉGIAS DE CONJUGAÇÃO ENTRE O TOCILIZUMAB E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIOCAMPATÍVEIS

Pedro Ivo Tonini Risolia Barbosa

Março/2024

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Ariane de Jesus Sousa Batista

Programa: Engenharia Química

Com o aumento da expectativa de vida da população, no mundo, as pessoas acometidas por doenças crônicas degenerativas têm a qualidade de vida depreciada, em razão de progressão da enfermidade, dos efeitos colaterais das medicações para o controle dessas morbidades, e de complicações clínicas, impactando o bem-estar em estágio mais avançado em seus últimos momentos de vida. Desse modo, evidencia-se a necessidade da modificação de medicamentos existentes ou da criação de novos medicamentos, que exerçam maior poder terapêutico com menores efeitos colaterais. Os Anticorpos Conjugados a fármacos (ADC) são uma nova classe de fármacos, que combinam o efeito terapêutico com o poder de direcionamento a alvos específicos, evitando o efeito sistêmico do tratamento convencional. Este estudo objetiva avaliar e comparar diferentes estratégias de imobilização química e física do anticorpo monoclonal Tocilizumabe em nanopartículas de Poli (Metacrilato de Metila) (PMMA), Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Acrílico) (P(MMA-co-AA)) e Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Metacrílico) (P(MMA-co-MAA)). Assim, descreve o desenvolvimento inicial de um ADC voltado para o tratamento de artrite reumatoide, através de avaliação de métodos de conjugação entre o Tocilizumab, anticorpo utilizado no tratamento da artrite reumatoide, e as nanopartículas poliméricas, comumente, utilizadas para o encapsulamento de medicamentos. Avaliou-se quatro métodos de imobilização das biomoléculas, levando-se em conta a eficiência de adsorção. Os resultados mostram que todos os métodos foram bem-sucedidos em realizar a imobilização, obtendo eficiências superiores a 60%. No entanto, o método com melhor desempenho de adsorção foi a adsorção física, seguida pelo emprego de estreptavidina e biotina, ácido indol 3-butírico e luz ultravioleta e, por fim, o emprego de Sulfo-NHS e EDC. Na análise

de reversibilidade da conjugação, a maior estabilidade foi obtida com o emprego de estreptavidina e biotina, seguido pela adsorção física, em segundo lugar, e ácido indol 3-butírico em terceiro. O uso de Sulfo-NHS e EDC teve o pior desempenho em todos os quesitos avaliados.

Abstract of dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN DIFFERENT LINKING STRATEGIES
BETWEEN TOCILIZUMAB AND BIOCOMPATIBLE POLYMERIC NANOPARTICLES

Pedro Ivo Tonini Risolia Barbosa

March/2024

Advisors: Helen Conceição Ferraz

Ariane de Jesus Sousa Bastista

Department: Chemical Engineering

The increase in life expectancy during recent years has enabled chronic diseases to further deteriorate patients quality of life. One of these chronic illnesses is rheumatoid arthritis. In this sense, there has been a rise in need for better treatment of these diseases. Antibody-Drug Conjugates (ADC) are a new class of drugs that combine the powerful effect of cytotoxic drugs and the specificity of monoclonal antibodies. In this study we evaluate four different strategies to link the monoclonal antibody Tocilizumab, commonly used to treat rheumatoid arthritis, to polymeric biocompatible nanoparticles that are commonly used to encapsulate drugs, in hopes that this is the first step towards an ADC to treat this illness. Data shows that all four strategies were successful in creating a linkage between nanoparticles and monoclonal antibody. However, physical adsorption has been the most successful, followed by Streptavidin and Biotin in a close second, Indol 3-Butyric Acid in a close third place. Using only Sulfo-NHS and EDC was the least successful strategy, showing both low yields in linkage and high rates of desorption.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
Introdução.....	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo geral.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
1.3 Estrutura da dissertação.....	4
CAPÍTULO 2	5
Revisão Teórica.....	5
2.1 Doenças crônicas.....	5
2.1.1 Artrite Reumatoide.....	6
2.2 Nanopartículas.....	7
2.2.1 Nanopartículas para aplicação farmacêutica.....	8
2.2.1.1 Nanossistemas de liberação controlada.....	9
2.2.1.2 Poli(Metacrilato de Metila).....	11
2.3 Preparo de nanopartículas poliméricas.....	12
2.4 Anticorpos.....	13
2.4.1 Tocilizumab.....	16
2.5 Anticorpos conjugados.....	16
2.5.1 Adsorção física.....	19
2.5.2 Adsorção química.....	20
2.6 Comentários finais.....	23
CAPÍTULO 3	26
Materiais e Métodos.....	26
3.1 Materiais.....	26
3.2 Equipamentos.....	27
3.3 Métodos.....	29
3.3.1 Produção de nanopartículas poliméricas.....	29
3.3.2 Caracterização das nanopartículas.....	31
3.3.2.1 Conversão gravimétrica.....	32
3.3.2.2 Potencial eletrocínético e distribuição de tamanho de partículas.....	32
3.3.2.3 Distribuição de massas molares.....	34

3.3.2.4 Morfologia.....	34
3.3.2.5 Temperatura de transição vítrea.....	35
3.3.2.6 Temperatura máxima de degradação.....	35
3.3.3 Ensaio de conjugação de anticorpos a nanopartículas.....	35
3.3.3.1 Adsorção física.....	37
3.3.3.2 Adsorção química com Sulfo-NHS + EDC.....	38
3.3.3.3 Adsorção química com Ácido Indol 3-Butírico (IBA)	39
3.3.3.4 Adsorção química com Biotina e Estreptavidina (SA).....	40
3.3.4 Análise quantitativa de adsorção.....	43
3.3.4.1 Análise de eficiência de adsorção.....	43
3.3.4.2 Análise de dessorção.....	43
3.3.5 Análise qualitativa de adsorção	44
3.3.5.1 Análise por FTIR.....	44
3.3.5.2 Análise por tamanho de partícula.....	44
CAPÍTULO 4	45
Resultados e Discussão.....	45
4.1 Preparo e caracterização de nanopartículas.....	45
4.1.1 Distribuição de tamanho e potencial zeta.....	45
4.1.2 Conversão de monômero em polímero.....	46
4.1.3 Distribuição de massa molar dos polímeros.....	47
4.1.4 Morfologia das nanopartículas.....	49
4.1.5 Temperatura de máxima degradação.....	50
4.1.6 Temperatura de Transição Vítrea (Tg).....	50
4.2 Conjugações de anticorpos.....	51
4.2.1 Adsorção física.....	51
4.2.1.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização.....	51
4.2.1.2 Análise de espectro infravermelho.....	53
4.2.1.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção.....	54
4.2.2 Adsorção química com Sulfo-NHS + EDC.....	55
4.2.2.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização.....	55
4.2.2.2 Análise de espectro infravermelho.....	57
4.2.2.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção.....	58
4.2.3 Adsorção química com Ácido Indol 3-Butírico e UV.....	59
4.2.3.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização.....	59
4.2.3.2 Análise de espectro infravermelho.....	60
4.2.3.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção.....	61

4.2.4 Adsorção química com Estreptavidina e Biotina.....	63
4.2.4.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização.....	63
4.2.4.2 Análise de espectro infravermelho.....	64
4.2.4.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção.....	65
4.3 Considerações finais.....	66
CAPÍTULO 5	69
Conclusões.....	69
5.1 Conclusão.....	69
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	69
CAPÍTULO 6	71
Referências.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição da expectativa de vida mundial média de ambos os sexos entre os anos de 1960 e 2021.....	5
Figura 2	– Representação da estrutura química do metacrilato de metila.....	11
Figura 3	– Representação de uma Imunoglobulina G genérica.....	15
Figura 4	– Representação da estrutura química do Sulfo-NHS e EDC.....	20
Figura 5	– Representação da reação de adsorção química utilizando Sulfo-NHS e EDC.....	21
Figura 6	– Representação da estrutura química do Ácido 4-(3-Indolil)butanoico (IBA)	22
Figura 7	– Representação da reação de adsorção química utilizando o Ácido Indol 3-Butírico e Luz Ultravioleta.....	23
Figura 8	– Representação da estrutura química dos polímeros Poli(Metacrilato de Metila), Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Acrílico) e Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Metacrílico), respectivamente.....	24
Figura 9	– Esquematização da reação de polimerização para produção das nanopartículas.....	30
Figura 10	– Sistema utilizado para a síntese das nanopartículas.....	31
Figura 11	– Esquematização do procedimento de lavagem.....	36
Figura 12	– Esquematização do ensaio de adsorção física.....	37
Figura 13	– Esquematização do ensaio de adsorção química com Sulfo-NHS + EDC.....	38
Figura 14	– Esquematização do ensaio de adsorção química com o Ácido Indol 3-Butírico.....	40
Figura 15	– Esquematização do ensaio de adsorção química com biotina e estreptavidina.....	42
Figura 16	– Resultado do ensaio de DLS, demonstrando a distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas.....	45
Figura 17	– Conversão dos monômeros em polímero ao longo da reação de polimerização.....	47
Figura 18	– Distribuição das massas molares das nanopartículas poliméricas.....	48
Figura 19	– Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas obtidas.....	49
Figura 20	– Ensaio de análise termogravimétrica (TGA)	50

Figura 21	– Ensaio de DLS realizado após os ensaios de adsorção física, ilustrando a nova distribuição de tamanho de partículas.....	52
Figura 22	– Gráfico de correlação entre os espectros infravermelhos dos polímeros puros e polímeros após a adsorção física.....	53
Figura 23	– Gráfico da eficiência de adsorção do método de adsorção física.....	55
Figura 24	– Ensaio de DLS realizado após conjugação utilizando Sulfo-NHS e EDC.....	56
Figura 25	– Correlação dos espectros de infravermelho das nanopartículas antes e após a adsorção com Sulfo-NHS + EDC.....	57
Figura 26	– Gráfico de eficiência de adsorção do ensaio de adsorção química utilizando Sulfo-NHS e EDC.....	58
Figura 27	– Distribuição de tamanho das nanopartículas antes e após o ensaio utilizando Ácido Indol 3-Butírico.....	59
Figura 28	– Correlação dos espectros de infravermelho das nanopartículas antes e após o ensaio utilizando Ácido Indol 3-Butírico.....	61
Figura 29	– Eficiência de adsorção do método utilizando Ácido Indol 3-Butírico.....	62
Figura 30	– Análise de DLS, ilustrando a nova distribuição de tamanhos após o ensaio de conjugação, utilizando estreptavidina e biotina.....	63
Figura 31	– Correlação entre os espectros de infravermelho das nanopartículas antes e após o ensaio utilizando estreptavidina e biotina.....	65
Figura 32	– Eficiência de adsorção do método utilizando estreptavidina e biotina.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Composição das soluções utilizadas na produção das nanopartículas poliméricas.....	30
Tabela 2	– Composição das soluções utilizadas para a produção da solução tampão fosfato.....	36
Tabela 3	– Composição das soluções utilizadas nos ensaios de adsorção física...	37
Tabela 4	– Composição das soluções utilizadas nos ensaios de adsorção com Sulfo-NHS + EDC.....	39
Tabela 5	– Lista de soluções utilizadas em cada etapa da adsorção química 2.....	39
Tabela 6	– Composição das soluções utilizadas nos ensaios de adsorção com biotina e estreptavidina.....	41
Tabela 7	– Tabela comparativa entre as diferentes nanopartículas sintetizadas.....	46
Tabela 8	– Comparação entre massa molar média ponderada (Mw), massa molar média numérica (Mn) e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas poliméricas produzidas.....	48
Tabela 9	– Comparação entre as temperaturas de transição vítrea dos polímeros obtidos e os polímeros descritos na literatura.....	51
Tabela 10	– Comparação entre os tamanhos originais das nanopartículas e os tamanhos após a adsorção física.....	52
Tabela 11	– Quantidade de anticorpos dessorvidos por lavagem e a porcentagem de anticorpos dessorvidos ao final das três lavagens.....	55
Tabela 12	– Comparação entre os tamanhos originais das nanopartículas e os tamanhos após adsorção com Sulfo-NHS + EDC.....	56
Tabela 13	– Quantidade de anticorpos dessorvidos após cada lavagem e porcentagem total de anticorpos dessorvidos ao final das três lavagens.	59
Tabela 14	– Tabela comparando os tamanhos das nanopartículas antes após o ensaio com Ácido Indol 3-Butírico.....	60
Tabela 15	– Quantidade de anticorpos dessorvida a cada lavagem e a porcentagem total de anticorpos dessorvidos após as três lavagens.....	63
Tabela 16	– Comparação entre os tamanhos das nanopartículas antes e após o ensaio com estreptavidina e biotina.....	63
Tabela 17	– Quantidade de anticorpos dessorvidos após cada lavagem e a porcentagem total dessorvida ao final das três lavagens.....	66

Tabela 18	– Comparação dos tamanhos antes e após as diferentes estratégias de conjugação e as porcentagens de adsorção e dessorção de cada método escolhido.....	67
------------------	--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	– Equação utilizada para calcular a taxa de conversão dos monômeros em polímero.....	32
Equação 2	– Equação conhecida como equação de Henri.....	33
Equação 3	Equação de Stokes-Einstein.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido Acrílico
ABC	<i>Antibody-Biologic Conjugates</i> ou Anticorpos conjugados a biomoléculas
AC	Anticorpos Conjugados
ADC	<i>Antibody-Drug Conjugate</i> ou Anticorpos conjugados a farmacos
ADCC	Anticorpos dependents de citotoxicidade celular
ANC	<i>Antibody-Nanoparticle Conjugates</i> ou Anticorpos conjugados a nanopartículas
Anti-CCP	Anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico
AR	Artrite Reumatoide
CMC	Concentração Micelar Crítica
DAR	<i>Drug-Antibody Ratio</i> ou Razão entre fármacos e anticorpos
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> ou Espalhamento dinâmico de luz
DMARDs	<i>Disease Modifying Antirheumatic Drugs</i> ou Fármacos antirreumáticos modificadores da doença
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorímetro diferencial de varredura
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FDA	<i>US Food And Drug Administration</i>
FTIR	Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
IBA	Ácido Indol 3-Butírico
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgD	Imunoglobulina do tipo D
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-6R	Receptor da Interleucina-6
IL-9	Interleucina-9
KPS	Persulfato de Potássio

MAA	Ácido Metacrílico
MMA	Metacrilato de metila
Mn	Massa molar numérica media
MTX	Metotrexato
Mw	Massa molar ponderal media
Mz	Massa Molar Z-Média
NBS	<i>Nucleotide Biding Site</i> ou Sítio de ligação do nucleotídeo
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i> ou Iniciativa Nacional de Nanotecnologia
P(MMA-co-AA)	Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Acrílico)
P(MMA-co-MAA)	Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Metacrílico)
PDI	Índice de Polidispersão
PGA	Poli(Ácido Glicólico)
PLA	Poli(Ácido Lático)
PLGA	Poli(Ácido Lático-co-Glicólico)
PMMA	Poli(Metacrilato de Metila)
SA	Estreptavidina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Sulfo-NHS	N-Hidroxisulfosuccinimida
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 Motivação

A Medicina tem passado por diversas etapas de desenvolvimento durante a expansão tecnológica mundial, graças a esforços científicos focados na maturação e criação de novos métodos de diagnóstico, cuidados e tratamentos de diversas enfermidades.

Essa melhora na capacidade de diagnóstico e tratamento, juntamente com a expansão e melhoria do saneamento básico para mais pessoas, faz com que a expectativa de vida tenha tido um salto considerável, atingindo a média mundial de 71 anos. Esse aumento na expectativa de vida também significa que doenças crônicas, como a Artrite Reumatoide, tenham mais tempo para progredir, trazendo a necessidade do desenvolvimento de medicamentos com menos efeitos colaterais e maior poder terapêutico, mesmo com os recentes avanços na indústria farmacêutica. Dentre estes avanços, vale destacar a utilização de polímeros biocompatíveis no âmbito de encapsulamento de fármacos e a utilização da nanotecnologia na criação de novas classes de medicamentos.

Os polímeros são macromoléculas, formadas pela junção de estruturas repetidas, chamadas de monômeros, e podem ser utilizadas para encapsular medicamentos, de forma que o proteja de degradações, sejam das intempéries do ambiente ou do corpo, após a aplicação. Isso faz com que o tempo de circulação no corpo seja maior, a possibilidade da administração de mais de um fármaco ao mesmo tempo, e ainda permite que sua superfície seja funcionalizada, a fim de garantir uma liberação direcionada e controlada (KUMAR, KUMBHAT, 2016).

No entanto, nem todo fármaco pode ser encapsulado. Alguns compostos bioativos necessitam que seu sítio ativo esteja exposto, o que dificulta a possibilidade de administrá-los com outro fármaco ou protegê-lo de degradações físicas, químicas ou biológicas. Um grupo destes compostos bioativos são os anticorpos monoclonais (ALVES, MUSTAFAOGLU, BILGICER, 2014).

Anticorpos são proteínas enoveladas com sítios catalíticos extremamente específicos localizados numa porção específica, chamada de porção Fab, ou região variável do anticorpo. Como seu sítio catalítico realiza funções extremamente específicas a uma substância ou receptor, a sua introdução na medicina humana

revolucionou o tratamento de cânceres, transplantes de órgãos, doenças autoimunes, cardíacas e pulmonares (SINGH *et al.*, 2018).

Uma das limitações dos anticorpos monoclonais e dos medicamentos encapsulados em nanoesferas é a rápida excreção do corpo, pelo fácil reconhecimento feito pelo sistema imunológico. Os medicamentos encapsulados ainda apresentam um outro defeito: sua aplicação é sistêmica, agindo em ambos tecidos saudáveis e acometidos pela enfermidade, aumentando a quantidade e intensidade dos efeitos colaterais.

Assim, surge uma nova classe de medicamentos denominada de Fármacos Conjugados a Anticorpos (Antibody-Drug Conjugate, ou ADC). Como esferas, são facilmente reconhecidas pelo sistema imune, ao realizar a conjugação com um anticorpo monoclonal, o reconhecimento pelo sistema imune acaba sendo dificultado. Similarmente, com a presença das moléculas introduzidas através da reação de conjugação, há um impedimento estérico na porção não-variável do anticorpo, dificultando sua excreção. Além disso, tira-se proveito da especificidade dos anticorpos monoclonais, direcionando os medicamentos até os locais alvo, aumentando o poder terapêutico e tempo de meia vida, além de diminuir os efeitos colaterais (ALVES, MUSTAFAOGLU, BILGICER, 2014; SUR *et al.*, 2019; Alves, 2019; CHEN *et al.*, 2020). Nesse contexto, é possível fazer a conjugação de biomoléculas através de adsorção física ou adsorção química, sendo o principal desafio manter exposto o sítio catalítico do anticorpo monoclonal após a conjugação (RAO *et al.*, 2008; CIOBANASU, SIEBRASSE, KUBITSCHECK, 2010; KLINE *et al.*, 2015; GHAFFARIAN *et al.*, 2016).

Processos de adsorção química são, em sua essência, reações químicas que tiram proveito de grupos, naturalmente presentes ou artificialmente colocados através de funcionalizações ou de edição gênica, como grupamentos amino, hidroxila, carboxilas ou tióis, formando uma ligação covalente entre a biomolécula e a nanopartícula. As adsorções físicas são realizadas através de ligações não específicas, como interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, van der Waals ou hidrofóbicas (RAMOS, 2018).

Neste estudo, o polímero poli(metacrilado de metila) (PMMA) foi selecionado, por ter baixo custo, alta biocompatibilidade e pela ampla literatura disponível. O PMMA tem sido utilizado em diferentes aplicações, como carreadores de fármacos, encapsulamento de fármacos, resinas ósseas, incluindo usos aprovados pelo *US Food and Drug Administration* (FDA). Dada a ausência de grupos funcionais capazes de realizar ligações covalentes, também foram introduzidos dois copolímeros, através da introdução do ácido acrílico (AA) e o ácido metacrílico (MAA) como comonômeros. Esses comonômeros adicionam grupos do tipo carboxílico à estrutura do polímero,

permitindo que sejam feitas funcionalizações através de ligações do tipo covalente, além de já serem empregados em aplicações biomédicas por serem biocompatíveis (LEMPERLE *et al.*, 2003; BETTENCOURT, ALMEIDA, 2012; ZHENG *et al.*, 2015; SAADE *et al.*, 2016).

Para maior taxa de sucesso na adsorção química de biomoléculas, pode ser necessária a utilização de agentes facilitadores, promovendo maior estabilidade da adsorção química, através de realização de uma ligação do tipo amida. Entre os agentes disponíveis, são utilizados o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e o N-Hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) por serem amplamente utilizados na conjugação de biomoléculas de diferentes tipos. Como a intenção é realizar a conjugação entre o anticorpo monoclonal Tocilizumabe e as nanopartículas poliméricas, empregou-se outros intermediários, que estão sob investigação na literatura, como o Ácido Indol-3-Butírico (IBA), e a Streptavidina (SA) e Biotina (THIRAMANAS *et al.*, 2013; ALVES, MUSTAFAOGLU, BILGICER, 2014; MANGIA, 2018; RAMOS, 2018; CHEN *et al.*, 2020; SULEIMAN *et al.*, 2020).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Iniciar o desenvolvimento de um medicamento da classe ADC para o tratamento de artrite reumatoide através da comparação de diferentes estratégias de adsorção, químicas e físicas, do tocilizumab em nanopartículas poliméricas biocompatíveis.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obter nanopartículas poliméricas através da técnica de polimerização em miniemulsão de MMA e dos comonômeros AA e MAA;
- Caracterizar nanopartículas em termos de tamanhos, cargas superficiais, propriedades térmicas, morfologias e estruturas químicas;
- Realizar ensaios de adsorção do anticorpo monoclonal Tocilizumabe sobre as nanopartículas na presença e na ausência de agentes intermediários (EDC, IBA e SA);
- Escolher a melhor estratégia entre elas, levando em conta a especificidade das adsorções, eficiência de adsorção e capacidade de evitar a dessorção.

1.3 Estrutura da dissertação

Este trabalho organiza-se em 6 capítulos. O Capítulo 1 é constituído por uma introdução e motivação, contextualizando a pesquisa e a necessidade do estudo e expõe os objetivos deste trabalho.

No capítulo 2 é realizada uma breve revisão teórica, durante a qual são abordados os principais temas que envolvem este trabalho, como o que são anticorpos, anticorpos conjugados, os benefícios de sistemas de liberação e a artrite reumatoide.

No capítulo 3 são expostos e detalhados os materiais e métodos utilizados neste estudo, incluindo equipamentos, técnicas e reagentes utilizados.

No capítulo 4 são expostos os resultados obtidos dos experimentos e estes são discutidos, expondo os prós e contra de cada método utilizado. No capítulo 5 estão presentes as conclusões do trabalho, juntamente com sugestões para futuros trabalhos. Por fim, no capítulo 6 estão listadas todas as referências bibliográficas utilizadas na elaboração desta dissertação.

CAPÍTULO 2

Revisão teórica

2.1 Doenças crônicas

Durante os últimos anos, a humanidade deu grandes saltos tecnológicos, saindo rapidamente do avião, em 1903, para a aterrissagem lunar, em 1969. Não foram apenas os conhecimentos e tecnologias referentes as aeronaves que avançaram, mas todos os fronts de conhecimento, em especial a área de saúde.

Com todo este aumento na capacidade humana de não somente diagnosticar doenças de forma mais rápida e precisa, também desenvolvemos a habilidade de tratá-las de forma mais rápida e poderosa. Ademais, também tivemos a melhoria de outros aspectos, como o saneamento básico. Todas essas mudanças juntas nos trouxeram um expressivo aumento da expectativa de vida da raça humana, pulando de 32 anos em 1960, para 71 em 2021, sendo ainda maior para países considerados desenvolvidos (UNITED NATIONS, 2022).



Figura 1 – Distribuição da expectativa de vida mundial média de ambos os sexos entre os anos de 1960 e 2021 (UNITED NATIONS, 2022)

Uma das consequências do aumento da expectativa de vida é o aumento de incidência de doenças crônicas, que podem ter diferentes origens e acometer diferentes órgãos. O Centro Nacional de Doenças dos Estados Unidos classifica doenças crônicas como condições que duram pelo menos um ano e requerem atenção médica e/ou limitam

atividades diárias. As principais são doenças cardíacas e infarto, câncer e diabetes (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022).

Este estudo foca a artrite reumatoide, uma doença crônica, que afeta as articulações e, conforme progride, inibe a movimentação das juntas acometidas através da erosão cartilaginosa, gerando diminuição do espaço articular (CARPENTER *et al.*, 2017).

2.1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença reumática, autoimune e inflamatória que afeta entre 0.5 e 1% da população mundial. Além disso, tem uma taxa de hereditariedade de cerca de 60% e se caracteriza pela progressiva deterioração das articulações acometidas, até que a mesma fique inutilizável através da destruição das cartilagens. Não obstante, ainda é comumente associada com aumento de incidência de osteoporose e maior risco de morte, devido a manifestações cardiovasculares e extra articulares (ALAMANOS, DROSOS, 2005; KURKÓ *et al.*, 2013; MEDINA *et al.*, 2018).

Inicialmente, seu tratamento era feito com medicamentos chamados de Medicamentos Antirreumáticos Modificadores da Doença (ou DMARDs, do inglês *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*), mais comumente o Metotrexato (MTX) e corticoides, principalmente a Prednisolona. Essa linha de tratamento traz alguns problemas inerentes da indústria farmacêutica convencional: protocolos de administrações periódicas sistêmicas, que aumentam em demasiado a concentração sérica do medicamento, muitas vezes ultrapassando a faixa terapêutica da concentração sanguínea e adentrando na faixa tóxica, além de envolver medicamentos de amplo espectro, afetando tecidos saudáveis e não-saudáveis, trazendo diversos efeitos colaterais e desconfortos ao paciente (CHATZIDIONYSIOU, VAN VOLLENHOVEN, 2011; SUR *et al.*, 2019; LUCAS, DIMMITT, MARTIN, 2019).

Com o avanço da biotecnologia farmacêutica, engenharia genética e bioinformática, recentemente surgiram novas formas de tratamento, através de biomoléculas. Esses novos tratamentos só foram possíveis após a elucidação dos mecanismos pró-inflamatórios da artrite reumatoide, apresentando um maior poder terapêutico que os tratamentos convencionais, ajudando pacientes que eram de difícil controle.

Os meios pelos quais essa doença se inicia e progride são bem complexos e, apesar de grandes esforços terem sido feitos para o avanço na compreensão dos mecanismos intrínsecos dessa doença, ainda não elucidamos por completo todas as rotas de sinalização responsáveis pela progressão da doença. O que se sabe é que,

inicialmente, há a infiltração de células do sistema imune, notavelmente linfócitos T e células B, que por motivos genéticos e/ou ambientais, começam a produzir anticorpos, como o fator reumatoide e anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), que reconhecem alvos nas articulações como não sendo do próprio corpo, formando então imunocomplexos (SCOTT, SMITH, KINGSLEY, 2003; CARPENTER *et al.*, 2017).

Esses imunocomplexos realizam uma mobilização maior do sistema imune para as regiões afetadas, desencadeando cascatas pró-inflamatórias através de moléculas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-9 (IL-9) (HUGHES-AUSTIN *et al.*, 2013, KURKÓ *et al.*, 2013).

Hoje, existem nove biomoléculas que podem ser utilizadas no controle da doença, sendo elas: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab Pegol, que são anticorpos monoclonais inibidores de Fatores de Necrose Tumoral (TNF), Anakinra, que é um inibidor da interleucina pró-inflamatória IL-1, Tocilizumab, que é inibidor da interleucina pró-inflamatória IL-6, Rituximab, que é um anticorpo depletor de células B, e Abatacept, que é um inibidor da co-estimulação das células T. Neste estudo, o foco se limitou ao Tocilizumab, um dos mais utilizados e efetivos (CHATZIDIONYSIOU, VOLLENHOVEN, 2011; KURKÓ *et al.*, 2013; McINNIS *et al.*, 2016, BURMESTER, POPE, 2017; HETLAND *et al.*, 2020).

2.2 Nanopartículas

O conceito que sedimentou a nanotecnologia começou a ser discutido em 1959, por Richard Feynman, considerado o “pai” da nanotecnologia, no qual ele dissertou sobre a possibilidade de síntese através de manipulação atômica. Não se sabia à época, mas já sintetizávamos nanopartículas há muito tempo, desde o império romano, que as utilizavam em vidros para que mudassem de cor, dependendo do ângulo de incidência da luz (BAYDA *et al.*, 2019).

O termo nanotecnologia, no entanto, só foi cunhado em 1974, quando Norio Taniguchi, a definiu como processos de separação, consolidação e deformação de materiais átomo a átomo ou molécula a molécula. Posteriormente, para abranger uma gama maior de processos, a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (NNI), dos Estados Unidos, passou a definir nanotecnologia como a ciência, engenharia, e tecnologia conduzida em escalas entre 1 a 100 nanômetros.

Distingue-se os métodos de produção de nanopartículas em dois grandes grupos: Os métodos Top-Down e os métodos Bottom-Up. As técnicas Top-Down podem ser descritas pela “quebra” de materiais em bulk, ou seja, em tamanhos macro, até

obtermos nanopartículas, enquanto as técnicas Bottom-Up se referem à construção de nanoestruturas átomo a átomo ou molécula a molécula.

Nos tempos modernos, com o avanço acelerado da produção científica mundial, se descobriu novos nanomateriais e aplicações para nanopartículas (BAYDA *et al.*, 2019). Este estudo se deteve nas aplicações voltadas para a saúde humana.

No quesito da saúde humana, as nanopartículas podem ser aplicadas de diversas formas. Pode-se utilizar nanopartículas de prata por suas propriedades bactericidas, conjugar quantum-dots a biomoléculas para a confecção de biosensores, fabricar nanoresinas para implante ósseo, entre outras aplicações. No entanto, uma das aplicações, que é o foco deste estudo, mais utilizadas nas indústrias atualmente é a de nanoencapsulamento de fármacos, para aumento de meia-vida, solubilidade, melhor penetração intracelular e perfis de concentração sérica, diminuição de frequência de administração e drug-delivery de fármacos (KUMARI *et al.*, 2010; KUMAR, KUMBHAT, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016; LIM, HAMID, 2018; SUR *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2020).

2.2.1 Nanopartículas para aplicação farmacêutica

Nanopartículas são largamente aplicadas na indústria farmacêutica, há muitos anos. Uma das diversas limitações do tratamento convencional de fármacos é devido a sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade, baixo tempo de meia vida pela degradação prematura promovida pelos diversos stresses exercidos pelo ambiente biológico e facilidade de excreção, além da possibilidade do paciente adquirir resistência aos medicamentos após repetidas administrações. Dessa forma, ao diminuir o tamanho das partículas administradas, incorporando ou conjugando os fármacos às nanopartículas, podemos aumentar a eficiência das terapias já existentes. Esse aumento da eficiência terapêutica é promovido em diferentes fronteiras, a depender do tipo de material utilizado e estratégia de imobilização (KUMARI *et al.*, 2010; SUR *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2020).

Uma das estratégias mais utilizadas na indústria farmacêutica é a conjugação de moléculas farmacêuticamente ativas, realizando a ligação destas com outras moléculas, modificando sua conformação e aumentando seu tempo de meia vida. Essa estratégia pode ser feita de diversas formas, adição de grupamentos éster, estratégia comumente utilizada em hormônios, adição de cadeias de etileno glicol, estratégia utilizada em proteínas e outros medicamentos, entre outras. Essa estratégia aumenta o tamanho da molécula e altera sua conformação, fazendo com que sua excreção ocorra de forma mais lenta, prolongando o tempo de meia vida e aumentando o espaçamento entre as

aplicações dos medicamentos (PASUT, VERONESE, 2009; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, SÁNCHEZ, 2015; STROHL, 2015).

Outra estratégia possível, é a conjugação de nanopartículas, como a nanopartículas de ouro, uma partícula comumente quimicamente inerte, mas que pode ser conjugada a moléculas que possuem enxofre, como proteínas, DNAs e outros fármacos (DWIVEDI *et al.*, 2015; DAVIDOVITS, 2019).

Uma abordagem interessante desenvolvida para aplicação farmacêutica é a criação de nanoestruturas nas quais podemos ter a presença dos fármacos no interior das mesmas, nos permitindo fazer com que a liberação do fármaco na corrente sanguínea seja gradual, conforme a estrutura se degrada, evitando grandes picos de concentração sérica e diminuindo o número de administrações medicamentosas necessárias durante o tratamento. Essas nanoestruturas podem ser simples ou complexas e são comumente referidas a nanossistemas de liberação controlada. Sistemas deste tipo podem ser confeccionados de diferentes materiais, como polímeros naturais e não naturais, e utilizando uma grande gama de técnicas, desde microfluídica até polimerização in-situ (JAWOREK, 2008; AWINO, ZHAO, 2015; SOUSA *et al.*, 2018, SUR *et al.*, 2019).

2.2.1.1 Nanossistemas de liberação controlada

A utilização de sistemas de liberação controlada em nanoescala já vem sendo estudada há algum tempo. Diferentemente da nanotecnologia, que convencionou a gama de tamanhos entre 1 a 100 nanômetros, os nanossistemas, para a medicina, residem entre 1 e 999 nanômetros e há, atualmente, diversos tipos de nanossistemas sendo investigados e utilizados na indústria farmacêutica, como nanotubos de carbono, dendrímeros, lipossomas, nanopartículas poliméricas, entre outros (DHIVYA *et al.*, 2018; SUNSHINE, PALLER, 2019).

Nanotubos de carbono são materiais nanométricos, formados por átomos de carbono organizados em formato cilíndrico, com a espessura de apenas um átomo. Essas estruturas podem apresentar diversas características secundárias, como mais de uma parede, terem sua superfície modificada para facilitar conjugações ou drug-delivery, até mesmo apresentarem compostos, como fármacos adsorvidos, com o intuito de entrega de medicamentos e liberação controlada (ANDREONI, 2000; KLINGELER, SIM, 2011; KUMAR, KUMBHAT, 2016).

Dendrímeros são moléculas tridimensionais, formadas por um núcleo a partir do qual são geradas ramificações que crescem e geram uma casca, que pode ser

funcionalizada com a finalidade de melhorar a solubilidade ou entrega da carga, que fica armazenada em seu interior (GAO *et al.*, 2020; JARAI *et al.*, 2020).

Lipossomas são esferoides formados por camadas fosfolipídicas e já vêm sendo estudadas há muitos anos, desde 1965, porém sempre encontraram como barreiras na indústria a baixa eficiência de encapsulamento e baixa estabilidade de armazenamento, barreira esta que parece estar sendo vencida, fato elicitado pela utilização desta tecnologia nas recém desenvolvidas vacinas contra Covid-19 das empresas Pfizer e Moderna. Como vantagens, trazem a capacidade de poder internalizar compostos hidrofílicos em seu interior e hidrofóbicos na sua casca lipídica, protegendo a carga de degradação e direcionando-a, reduzindo efeitos colaterais (TORCHILIN, 2005; CHEVALIER *et al.*, 2015; Paiva *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2020; LIMA, RIBEIRO JR, 2021).

Por fim, outra tecnologia muito estudada e empregada na indústria farmacêutica são as nanopartículas poliméricas como sistema de administração e transporte de fármacos. Essas nanopartículas podem ter os princípios ativos encapsulados, aprisionados em matriz ou até mesmo dissolvidos em sua estrutura, a depender do método de preparação empregado e devem apresentar tamanhos entre 20 a 100 nanômetros, pois aumenta o poder de penetrar nas células, a solubilidade e o tempo de meia vida. Desta forma, melhorando os parâmetros farmacocinéticos (VERMA *et al.*, 2011; ELSABAHY, WOOLEY, 2012; SUR *et al.*, 2019).

Esses sistemas poliméricos apresentam algumas vantagens, como a possibilidade de modular a composição e a possibilidade de se projetar uma estrutura matricial. Não obstante, esse sistema vem sendo vastamente empregados em estudos de nanomedicina, inclusive já existentes em medicamentos aprovados para uso humano por sua ótima biocompatibilidade e biodegradabilidade, não toxicidade, boa estabilidade e baixa reatividade. Esses sistemas podem desempenhar papel de suporte para biomoléculas, atuar como carreadores, ter sua superfície modificada para melhorar o drug-delivery e agir como nano-reatores (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009; KUMARI *et al.*, 2010; GHARIEH *et al.*, 2019; JARAI *et al.*, 2020).

Materiais poliméricos, incluindo suas nanopartículas, são longas cadeias de moléculas repetidas, às quais são denominadas monômeros, podendo ser ramificadas ou não. Outra divisão importante a ser feita é entre polímeros sintéticos e naturais. Enquanto os naturais são feitos à partir de fontes disponíveis da natureza, como proteínas e quitosana, os sintéticos são derivados de fontes diferentes, comumente o petróleo. Pode-se citar como exemplos o Poli(Metacrilato de Metila) (PMMA), Poli(Ácido Lático-co-Glicólico) (PLGA), Poli(Ácido Lático) (PLA), Poli(Ácido Glicólico) (PGA), entre outros (SUR *et al.*, 2019; JARAI *et al.*, 2020).

Polímeros dentro de uma mesma classe, como a dos sintéticos, apresentam uma diversa variedade de propriedades, podendo ou não ser combinados para atingir características ótimas para uma aplicação específica. Por exemplo, o PGA se degrada rapidamente, enquanto o PLA apresenta uma taxa lenta de degradação. Se o objetivo é o encapsulamento de fármacos, não são propriedades interessantes. No entanto, a combinação dos dois monômeros desses polímeros resulta no polímero PLGA, que se coloca no meio entre os dois, podendo ter sua velocidade de degradação maior ou menor a partir da proporção de cada um dos monômeros adicionados na reação. Isto faz com que o PLGA tenha sido bastante estudado para aplicações biomédicas de liberação controlada, como o encapsulamento de anticorpos (CHEN *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; JARAI *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020).

Outro polímero amplamente estudado para aplicação em liberação controlada é o Poli(Metacrilato de Metila). Há estudos para a produção de vacinas, sistemas carreadores por diferentes vias de administração e até mesmo encapsulamento de medicamentos como o Praziquantel. Além de ser biodegradável e biocompatível, esse polímero apresenta uma fácil escalabilidade de processo de produção, se tornando extremamente atrativo para a indústria farmacêutica (BETTENCOURT, ALMEIDA, 2012; CASTOR JR *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Poli(Metacrilato de Metila)

O poli(metil-2-metilpropenoato), também conhecido como PMMA ou poli(metacrilato de metila) é um polímero de baixo custo, acrílico, biocompatível, apresentando como propriedades mecânicas dureza, rigidez, apesar de quebradiço, e alta resistência química (CANEVAROLO JR, 2010; BETTENCOURT, ALMEIDA, 2012; FEUSER *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2016; MANGIA, 2018; CASTOR JR *et al.*, 2019).

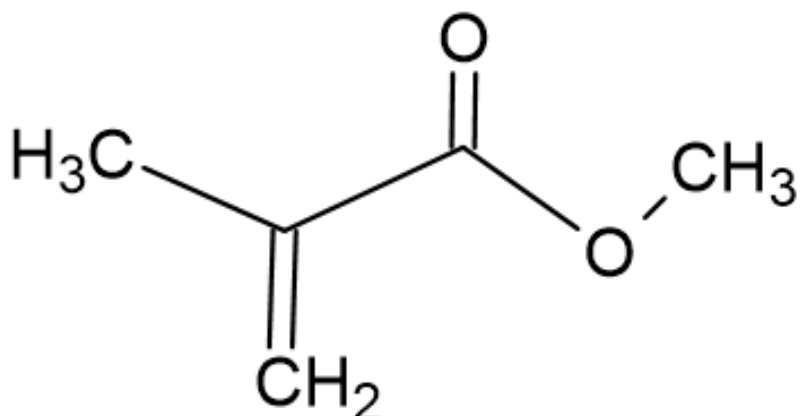


Figura 2 – Representação da estrutura química do Metacrilato de Metila

O primeiro trabalho sobre a biocompatibilidade do PMMA foi publicado em 1976 por Kreuter e Speiser e, desde então, vem sendo amplamente estudado para aplicações biomédicas, cosméticas, ortopédicas, farmacêuticas, e ortodônticas, incluindo um medicamento já aprovados para uso em humanos, como o Artecoll® (LEMPERLE *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2008; BETTENCOURT, ALMEIDA, 2012; LORCA *et al.*, 2012; VAISHYA *et al.*, 2013; PANAHI-BAZAZ *et al.*, 2014; CASTOR JR *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2019).

2.3 Preparo de nanopartículas poliméricas

Como mencionado anteriormente, existem duas formas principais de preparo de nanopartículas, top-down e bottom-up. Essa classificação também se aplica às nanopartículas poliméricas.

Para preparos do tipo top-down, são utilizadas moléculas poliméricas em tamanho macro e, através de alguns processos físico-químicos, são transformadas em nanopartículas, os principais sendo salting-out, diálise, nanoprecipitação ou evaporação de solventes (LIM, HAMID, 2018; SUR *et al.*, 2019).

Nos métodos de preparo do tipo bottom-up, parte-se de moléculas unitárias, os monômeros, que se ligam a outros monômeros, formando polímeros, fenômeno chamado de polimerização. No caso do PMMA, a reação mais utilizada é a de poliadição, podendo ser em emulsão, suspensão ou miniemulsão, que pode ser dividida em três etapas: Iniciação, Propagação e Terminação.

A primeira etapa, a iniciação, começa com a decomposição, normalmente térmica, de um reagente químico ativador, transformando-se em uma espécie ativadora, reagindo com um monômero, dando início à reação de polimerização. A segunda etapa, a de propagação, é onde ocorre o crescimento das cadeias poliméricas. Já a etapa de terminação é quando ocorre a interrupção do crescimento dessas cadeias, por se ligarem à uma molécula inerte ou entre duas moléculas reativas (MANO, MENDES, 1999; MENDES *et al.*, 2012).

Quando a produção de PMMA é voltada para a indústria farmacêutica, é ideal que haja um controle maior do tamanho das partículas produzidas. Distribuições de tamanho muito amplas de tamanho são prejudiciais para a farmacodinâmica e, portanto, para a aprovação por agências regulatórias. Por isso, os métodos mais indicados são as emulsões e miniemulsões.

A polimerização em emulsão é caracterizada por elevadas taxas e grau de polimerização, um fácil controle de temperatura, fácil remoção do monômero residual, iniciador hidrossolúvel, e concentração de surfactante acima da concentração micelar

crítica (CMC). Esses surfactantes são moléculas que contêm regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, podendo se organizar no formato de uma micela, que é onde ocorrerão as polimerizações, como se fossem pequenos reatores. Esses pequenos reatores são alimentados então, gradualmente, por grandes gotas de monômeros, estabilizadas por emulsificantes através da difusão (LUCENTE, 2008; VAN HERK, 2015; CAPEK, 2019; GHARIEH *et al.*, 2019).

A polimerização em miniemulsão se difere da polimerização em emulsão convencional em alguns pontos. Como as gotas de monômero são bem menores, e, portanto, há maior superfície específica, prevalece o mecanismo de nucleação das gotas, o que dispensa a formação de micelas de surfactante. Para tanto, é necessária a adição de surfactantes em grandes quantidades aplicação de trabalho mecânico adicional pela utilização um homogeneizador de alta pressão ou um ultrassonicador para que a distribuição de tamanho das gotas fique na faixa nanométrica desejada. Essa técnica de polimerização se destaca pela possibilidade facilitada de encapsulamento de compostos químicos, distribuição de tamanho das partículas mais adequada para a indústria farmacêutica, produtos com alta estabilidade, com robusta literatura disponível indicando o uso em diversas aplicações, incluindo trabalhos do grupo dos laboratórios envolvidos nesta pesquisa como encapsulamento de Praziquantel, Tamoxifeno, e Benzofenona-3 (LUCENTE, 2008; LORCA *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2016).

2.4 Anticorpos

Paul Ehrlich, no século XIX, cunhou o termo anticorpo, sugerindo que tais moléculas seriam capazes de neutralizar seus alvos sem que atingissem tecido saudável, problema comumente enfrentado pela alopatia convencional. No entanto, a utilização destes se mostrou um tanto quanto problemática, uma vez que soro de animais imunizados comumente produziam efeitos colaterais, além da dificuldade de serem produzidos em lotes consistentes. Somente na década de 70, quando a técnica de fusão entre clone de linfócito B e um mieloma, a partir de células de camundongo, foi desenvolvida, é que passou a ser possível a utilização destas moléculas na medicina. Nos anos que se sucederam, diversos avanços tecnológicos na produção de anticorpo foram feitos, permitindo a humanidade a produzi-los com maior produtividade, ações cada vez mais específicas e, ao substituir as cadeias do anticorpo de camundongo por cadeias humanizadas ou completamente humanas, com cada vez menos efeitos colaterais (KÖHLER, MILSTEIN, 1975; MEEKER *et al.*, 1985; ROQUE *et al.*, 2004; ADAMS, WEINER, 2005; WEINER, 2007; TAMASHIRO, AUGUSTO, 2008).

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são macromoléculas, do grupo das glicoproteínas, compostas por cadeias polipeptídicas, divididas em dois grupos diferentes: uma delas são chamadas de porção fragmento cristalizável (Fc), com aproximadamente 50kDa cada, e a outra de porção fragmento de ligação ao antígeno (Fab), com 25 kDa cada. Esses fragmentos também podem receber o nome de cadeia pesada e leve, respectivamente. Cada cadeia leve e pesada, no caso da Imunoglobulina G, forma um dímero e cada dímero é unido ao outro por ligações dissulfeto, chamada de dobradiça, que pode ser rígida ou flexível, conferindo aos anticorpos o conhecido formato em Y (MURPHY *et al.*, 2010; SPEARMAN *et al.*, 2011).

Existem diversas classificações dentre os anticorpos, sendo, de acordo com o livro *Molecular Biology of the Cell*, uma das mais comum em relação a sua estrutura de cadeias leves e pesadas, que resultam em cinco classes diferentes de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. As Imunoglobulinas A (IgA) são predominantes em secreções mucosas, Imunoglobulinas D (IgD) ainda não têm sua função completamente elucidada, sendo comumente expressada por diversos seres vivos com sistema imune adaptativo e sendo parte da membrana plasmática de linfócitos B. Já as Imunoglobulinas E são normalmente associadas a respostas alérgicas, enquanto as IgM formam pentâmeros e são responsáveis por 10% do conjunto total de imunoglobulinas, fazendo parte da resposta inicial do sistema imune. No entanto, a imunoglobulina mais estudada é a IgG, que são produzidas e excretadas pelos linfócitos B plasmáticos, presentes em maior número no sangue que as demais, compondo aproximadamente 75% da quantidade total de imunoglobulinas séricas, também apresentam uma maior estabilidade, um maior tempo de meia vida e maior facilidade de purificação por afinidade. Não obstante, essa classe de imunoglobulinas, apresenta uma ligação das porções Fc através do resíduo 297, que é uma asparagina (Asn297). Essa ligação pode apresentar diferenças, o que permite uma subsequente divisão desta classe de imunoglobulinas em 4 subgrupos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (MURPHY *et al.*, 2010; JOSTOCK, 2011; SPEARMAN *et al.*, 2011; VIDARSSON *et al.*, 2014).

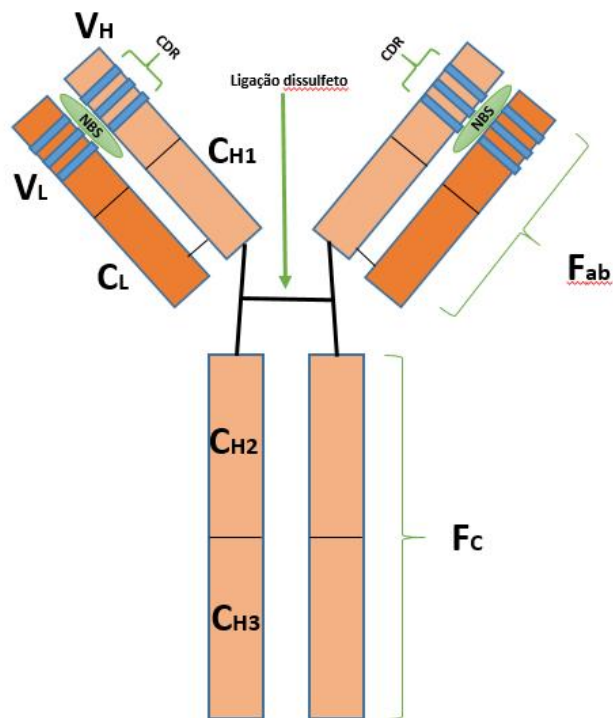


Figura 3 – Representação de imunoglobulina G (IgG) genérica, com as regiões determinantes de complementaridade (CDR), o sítio de ligação de nucleotídeos (NBS), além das ligações dissulfeto, as segmentações Fc e Fab, com duas cadeias pesadas (laranja claro) e duas cadeias leves (laranja escuro), a divisão em, VL e CL e VH e CH, correspondente a região variável leve (VL), constante leve (CL), variável pesada (VH) e constante pesada (CH).

Apesar dessas diferentes classificações, elas não dizem respeito ao mecanismo de ação das moléculas supracitadas. As regiões do anticorpo responsáveis pelo mecanismo de ação são denominadas de regiões determinantes de complementaridade (CDR, do inglês complementary determining region), são as que fazem reconhecimento e ligação das moléculas-alvo do anticorpo, localizadas na porção Fab dos anticorpos. Os mecanismos de ação não estão, atualmente, completamente elucidados, porém podem ser feitas três grandes divisões de mecanismos conhecidos, não sendo mutuamente exclusivos (ou seja, um anticorpo é pode ou não exercer mais de uma função ao mesmo tempo): Os anticorpos que são dependentes da participação do sistema imune do paciente (ADCC, do inglês Antibody dependent cellular cytotoxicity), realizando a sinalização e recrutando os mecanismos de sistema efetor, e os anticorpos que agem de forma independente, se ligando a receptores celulares e, então, inibindo ou iniciando cascatas referentes aos receptores alvo e/ou se ligando a moléculas que atingem receptores na superfície celular, impedindo que esta ligação ligante-receptor ocorra. Ademais, ainda é possível que o anticorpo seja um agente recrutador do sistema

complemento (CDC, do inglês *Complement dependent cytotoxicity*) (WEINER, 2007; SPEARMAN *et al.*, 2011; ROGERS *et al.*, 2014).

A nomenclatura não comercial de anticorpos segue uma regra de acordo com o alvo da molécula, organismo de origem e sua estrutura, terminando com o sufixo –mab. Anticorpos mais recentes, que apresentam estrutura completamente humana, recebem a letra u antes do sufixo. Já os humanizados ganham zu, e os quiméricos xi. Por fim os ultrapassados, de origem murina, recebem o (SINGH *et al.*, 2018).

2.4.1 Tocilizumab

O Tocilizumab é uma imunoglobulina do tipo G1 e, como indica o fonema zu, apresenta uma estrutura humanizada, com uma massa total de 148 quiloDaltons. É comercializado sob o nome comercial de Actemra® pela farmacêutica Roche®, é indicado para o tratamento de artrite reumatoide, Síndrome de liberação de citoninas oriundas de infecções graves de Sars-Cov-2, e doença de Castleman, além de demonstrar potencial para o tratamento de doença de Crohn, Arterite Takayasu, Lupus eritematoso sistêmico, Doença de Still refratária, Arterite de células gigantes (SUZUKI *et al.*, 2010; VENKITESHWARAN, 2009; SHEPPARD *et al.*, 2017; KHALI *et al.*, 2020).

A estratégia utilizada para a criação desse medicamento foi através da fusão das regiões determinantes de complementaridade de uma IgG1 anti-humano de receptores de IL-6 com uma IgG1 humana. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação com os receptores de Interleucina-6 (IL-6R), tanto os que são solúveis, quanto os que se encontram imobilizados na membrana celular, impedindo, de forma competitiva, que a IL-6 se ligue, e, portanto, evitando que a cascata pró inflamatória que seria desencadeada, em caso da ocorrência de ligação (VENKITESHWARAN, 2009; OLDFIELD *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2010; SHEPPARD *et al.*, 2017).

2.5 Anticorpos conjugados

As imunoglobulinas, através de suas regiões determinantes de complementaridade, exibem uma afinidade muito específica a alguma molécula ou receptor. Essa característica a permite agir em locais específicos onde há a maior expressão e presença destas moléculas-alvo (CHEN *et al.*, 2020; WEINER, 2007).

Em contraste, na medicina alopática comum, os medicamentos são administrados de forma sistêmica, apresentando ação da mesma forma, de modo que sua ação ocorra tanto em tecidos desejados, quanto em tecidos não desejados. Essa

característica da alopatia é comumente associada ao aparecimento de diversos efeitos indesejados, os colaterais, incluindo hepatotoxicidade (CASI, NERI, 2012).

Uma das estratégias para contornar este ponto negativo é o emprego da tecnologia de encapsulamento, permitindo uma liberação controlada do medicamento ao longo do tempo, reduzindo os picos e vales da concentração sérica medicamentosa, aumentando o tempo em que ele permanece na faixa terapêutica. Não obstante, outra possível alternativa é o uso de sistemas de entrega direcionada, eliminando, ou pelo menos reduzindo, a característica sistêmica da alopatia convencional, permitindo a redução dos sistemas colaterais, ao poupar tecido saudável (SOUSA *et al.*, 2016).

Uma das estratégias para o desenvolvimento de entregas direcionadas é a utilização da alta especificidade apresentada pelas imunoglobulinas. A racionalidade utilizada é que, se for possível identificar moléculas ou biomarcadores específicos para as enfermidades desejadas, é possível engenheirar um anticorpo que é específico para esses alvos. Desse modo, seria racional pensar que, caso fosse possível conectar um medicamento ao anticorpo criado, este agiria como um carreador do medicamento até o local alvo. É exatamente nesta linha de pensamento que a criação da tecnologia de conjugação de anticorpos está focada, com uma vasta literatura indicando o poder de direcionamento sítio-específico dos anticorpos conjugados a nanopartículas (*Antibody-Nanoparticle Conjugates*, ou ANC), medicamentos (*Antibody-Drug Conjugates*, ou ADC) ou moléculas biológicas (*Antibody-Biologic Conjugates*, ou ABC). Comumente, apesar de cada um possuir sua própria nomenclatura, não é incomum ver na literatura o termo ADC sendo utilizado de modo genérico para todos os casos (CASI, NERI, 2012; SOUSA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2020).

Paul Ehrlich chamou os anticorpos de “balas mágica”. Trata-se de moléculas proteicas complexas, formadas por várias centenas de aminoácidos e apresentando um peso molecular de milhares de Daltons. Além disso, apresentam enovelamento um tanto quanto complexo, formando estruturas terciárias ou até mesmo quaternárias, a depender da imunoglobulina estudada. É de se esperar, portanto, que seja possível utilizar de diversas estratégias diferentes para se aproveitar dessa capacidade de direcionamento apresentada pelas imunoglobulinas. No entanto, apesar de estratégias completamente distintas poderem ser empregadas no desenvolvimento deste tipo de sistema, todas elas apresentam uma característica em comum: Tentar ao máximo homogeneizar o DAR (ALVES, 2019).

A razão medicamento-anticorpo, DAR sigla em inglês para *Drug-Antibody Ratio*, é a razão entre o número de medicamentos conjugados por anticorpo. A depender do método utilizado para realizar a conjugação entre medicamento, ou partícula, e anticorpo, podemos ter valores diferentes atribuído a este índice. Um mesmo método

pode apresentar possibilidades de valores diferentes, a depender de como a reação ocorreu em cada anticorpo. Padronizar esse valor é de suma importância, pois impacta diretamente a farmacodinâmica e a capacidade de lotes consistentes do medicamento serem produzidos. Dessa forma, é importante que haja uma baixa variação para que a aprovação, para uso em humanos, por agências regulatórias seja facilitada ou até mesmo possível (CAL *et al.*, 2014; KLINE *et al.*, 2015; ALVES, 2019).

No que diz respeito a métodos de conjugação de anticorpo, há uma vasta literatura disponível. Alguns métodos de conjugação, como a utilização das lisinas ou cisteínas naturalmente disponíveis para ligação na estrutura do anticorpo, permitem que haja a conjugação em diferentes regiões do anticorpo. Apesar de ser uma característica não muito desejável, pois também afeta a farmacodinâmica, existem ADCs em estágio avançado de testes clínicos, ou até mesmo disponível comercialmente, como o Brentuximab Vedotin ou Ado-Trastuzumab Emtansine, aprovados pela agência regulatória dos estados unidos para tratamento de Linfoma de Hodgkin e câncer de mama metastático, respectivamente. Essas conjugações são classificadas como não-específicas e naturais (ALVES, 2019).

Outra possibilidade de conjugação a ser utilizada são as denominadas específicas e naturais, que envolve as estruturas naturalmente disponíveis, como é o caso da ligação no sítio de ligação de nucleotídeo (*Nucleotide Biding Site*, ou NBS) ou da biotina perto da região C-Terminal do anticorpo (THIRAMANAS *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2014; ALVES, 2019).

Anticorpos, assim como outras proteínas recombinantes, passam por modificações pós-tradução, as chamadas glicosilações, que nada mais são que a introdução de cadeias glicosídicas depois que a proteína já foi expressa. Cada microorganismo realiza este processo de formas diferentes e é possível realizar a digestão parcial dessas cadeias para que algum grupamento específico, que ocorra naturalmente e previamente não disponível, fique exposto e possa participar da reação de conjugação (ALVES, 2019).

Por fim, há a possibilidade de serem introduzidos grupamentos, que não ocorrem de forma natural, na estrutura do anticorpo, disponibilizando um sítio específico para que a conjugação ocorra. Esse tipo de conjugação, denominada sítio específica e não natural, apresenta uma menor variação de DAR quando comparado a outros métodos, mas enfrenta os desafios e percalços da engenharia genética, assim como a produção de fragmentos de anticorpo (SOUSA *et al.*, 2016; ALVES, 2019).

A porção que faz o reconhecimento de antígeno e, portanto, responsável pela especificidade, como já mencionado, é a região determinante de complementaridade. É nessa linha de pensamento que surgiu o desenvolvimento de fragmentos dessa região

do anticorpo. Como ele é 100% engenheirado, há a possibilidade de adicionar sítios de ligação específicos para a conjugação, permitindo que a ligação entre carga e fragmento seja feita através de rotas químicas específicas bioortogonais, como a click-chemistry, o que ajuda a reduzir a variação do valor de DAR. Outra possibilidade permitida por estes fragmentos, também denominados de nanobodies, é a criação de medicamentos com múltipla especificidade, além de apresentarem estabilidade e afinidade de ligação igual ou superior aos anticorpos tradicionais. No entanto, como há a necessidade de realizar engenharia genética, além da expressão em sistema biológico e separação das moléculas, conjugações em grupamentos não naturais fogem do tempo e escopo deste trabalho (HEUKERS *et al.*, 2014a; SOUSA *et al.*, 2016; VAN LITH *et al.*, 2017; ALVES, 2019).

Há bastante potencial para o desenvolvimento tecnológico de conjugados de anticorpos, que é um mercado ainda pouco explorado. Como mencionado, ao fundir a alopatia convencional com a especificidade e direcionamento de anticorpos, é possível criar medicamentos com maior poder terapêutico e menor quantidade de efeitos colaterais. Atualmente há pelo menos 14 ADCs comercialmente aprovados para uso em humanos e mais de cem em algum estágio de teste clínico e representam um mercado bilionário a ser explorado. De acordo com a análise de mercado da *Grand View Research*, o mercado de anticorpos monoclonais (mAbs), em 2022, atingiu a marca de US\$210 bilhões, dentre os mais de cem mAbs aprovados para uso em diferentes tipos de enfermidades. Comparativamente, o mercado de ADCs está previsto para atingir a marca de US\$16 bilhões, com somente o trastuzumab deruxtecan representando uma movimentação de cerca de US\$6.2 bilhões. Levando em consideração que todos os ADCs aprovados atualmente e a grande maioria em testes clínicos estão voltados somente para o tratamento de câncer, isso evidencia que há enorme capacidade de expansão para outras doenças. A artrite reumatoide, por exemplo, que em 2009 apresentava um mercado de aproximadamente US\$10.7 bilhões, com crescimento anual em torno de 20%, ainda tem seu mercado de anticorpos conjugados comercialmente inexplorado (SCHEINECKER *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2020; PAZO *et al.*, 2021; SHASTRY *et al.*, 2023; ZHIWEN *et al.*, 2022).

2.5.1 Adsorção física

Na adsorção física, também conhecida como fisissorção, há uma ausência de reação química, ou seja, há uma atração em nível molecular regida por interações não específicas de longo alcance, como interações hidrofóbicas, que não requerem interações entre grupos funcionais. Além disso, ocorrem também interações

elestroestáticas, que dependem da carga parcial das moléculas, que pode ocorrer através da introdução de copolímeros (como ácido metacrílico e ácido acrílico). Há a ação de forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (BEE *et al.*, 2009; PEIXOTO, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2016; TRINO, 2018; SANDHYARANI, 2019).

Nesse tipo de adsorção, como as interações são de relativo longo alcance, não é necessário contato direto entre adsorvente e adsorvato, podendo ocorrer a formação de múltiplas camadas de moléculas adsorvidas na superfície. Como vantagens, ressalta-se a simplicidade deste método de adsorção, resultando em custos diminutos e, como há ausência de ligação, o formato e, portanto, a atividade é preservada. No entanto, apresenta como desvantagens a possível dessorção de moléculas que apresentem interações mais fracas e a inabilidade deste método de garantir a exposição da região determinante de complementaridade do anticorpo ao meio aquoso, necessário para que o anticorpo exerça sua função (WEINER, 2007; SANDHYARANI, 2019).

2.5.2 Adsorção química

Por sua vez, na adsorção química, também conhecida como quimissorção, como o próprio nome indica, ocorrem reações químicas e uma subsequente formação de ligação química entre as moléculas adsorvidas, no caso deste trabalho, o Tocilizumab, e a superfície do polímero. Esse tipo de conjugação apresenta estabilidade superior a adsorção física, sendo, normalmente, irreversível. No entanto, não há garantias de que a conformação molecular, e atividade do anticorpo, se mantenha intacta após a adsorção (CAMPOS *et al.*, 2016; SANDHYARANI, 2019).

Uma das estratégias mais comuns na funcionalização entre polímeros e copolímeros, em que existam grupos carboxílicos presentes, e biomoléculas, é o uso de agentes intermediários para a funcionalização, que podem agir como espaçadores, aumentando o espaço entre a superfície e a biomolécula, ou como ativadores, para melhorar a performance da adsorção química (HOSSEINI *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015).

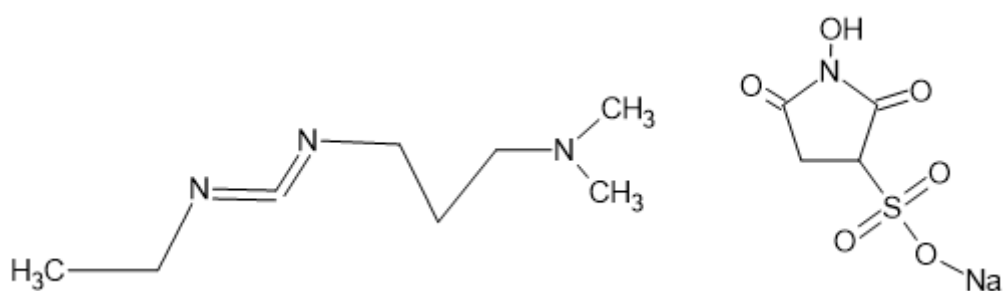


Figura 4 – Representação da estrutura química do Sulfo-NHS e EDC

Como agentes ativadores, carbodiimidas são comumente escolhidas para exercer essa função e o mais empregado é o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, também chamado de EDC, que conjuga proteínas e peptídeos, através de ligações isopeptídicas a partir dos grupamentos amina das cadeias laterais das biomoléculas, em nanopartículas poliméricas formando ligações amida. Esse método de adsorção já é bem descrito na literatura, incluindo conjugação do Tocilizumab a outros polímeros com testes pré-clínicos iniciados, com o auxílio de Sulfo-NHS (N-Hidroxisulfosucinimida). As succinimidas são moléculas comumente empregadas na conjugação entre anticorpos e medicamentos, inclusive utilizado na produção do Trastuzumab Entansina, ADC aprovado para uso humano, indicando a manutenção da atividade do anticorpo após a reação (GRABAREK, GERGELY, 1990; HERMANSON, 2013; YAN *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2020; JEON *et al.*, 2023).

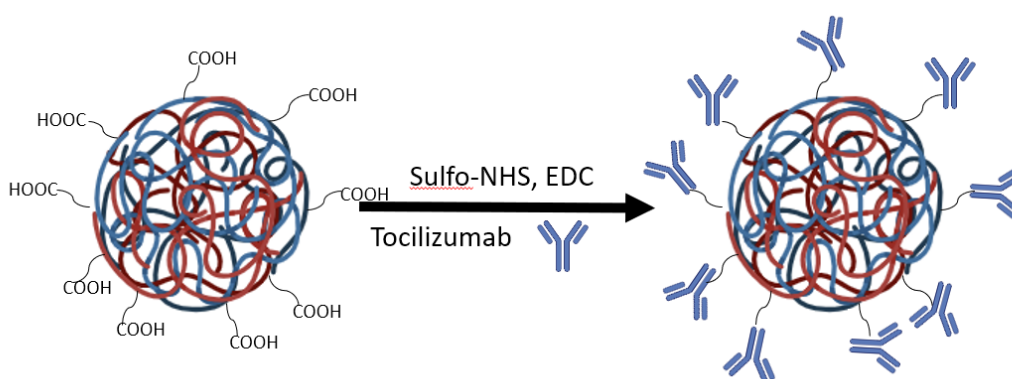


Figura 5 – Representação da reação de adsorção química utilizando Sulfo-NHS e EDC

Além de utilização de Sulfo-NHS e EDC, como representado na Figura 5, para a imobilização de anticorpos, existem outros métodos utilizados na literatura que permitem a conservação da seletividade dessas moléculas. Moléculas de Estreptavidina (SA) exibem alta afinidade por moléculas de biotina, se ligando rapidamente, que por sua vez exibem alta afinidade por proteínas, sem causar alterações conformacionais devido seu tamanho diminuto, preservando a atividade dos anticorpos. O processo de ligar uma molécula de biotina a uma proteína é denominado de biotinição. Enquanto esse método é comumente utilizado na produção de sensores baseados em anticorpos monoclonais, com o intuito de imobilizá-los na superfície do sensor, há alguns anos vêm sendo

investigado na conjugação de anticorpos a outras moléculas (ALVES *et al.*, 2013; THIRAMANAS *et al.*, 2013; ALVES, 2019; HOFFMANN *et al.*, 2020).

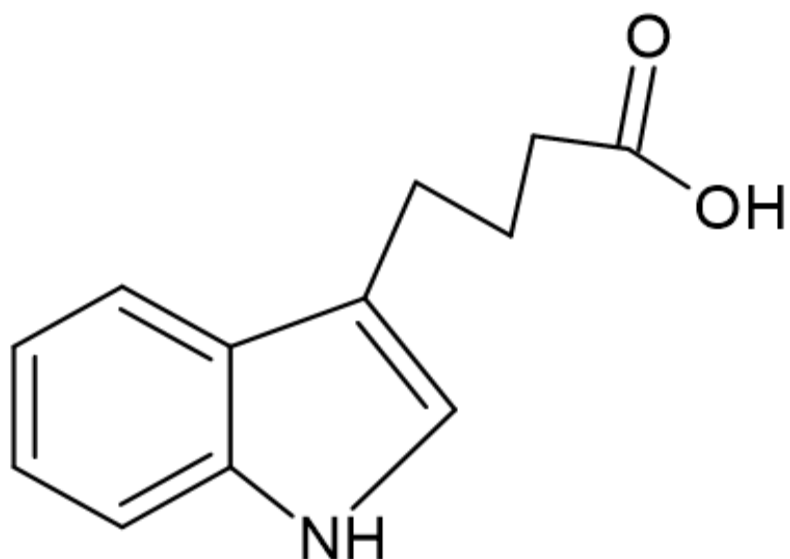


Figura 6 – Representação da estrutura química do Ácido 4-(3-Indolil)butanoico (IBA)

Dentre as muitas outras técnicas disponíveis para conjugação, outra que chama bastante a atenção é a utilização do Ácido Indol-3-Butírico (IBA), uma biomolécula expressada pelas diferentes espécies de salgueiro. Essa molécula, sob a incidência de luz ultra-violeta no comprimento de 254 nanômetros, se liga a uma região conhecida como NBS (Sítio de ligação de nucleotídeo, ou *Nucleotide Binding Site*, em inglês), ilustrado na Figura 7. Essa região é altamente conservada em diversos anticorpos e a ligação neste local, mantém a exposição da CDR ao meio aquoso. Apesar de sua localização ser proximal à região de determinação de complementaridade, vem sendo estudada como sítio de conjugação, com a literatura disponível mostrando que há a manutenção da atividade dos anticorpos após realizada a conjugação (ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013a, 2013b; ALVES *et al.*, 2014; ALVES, 2019).

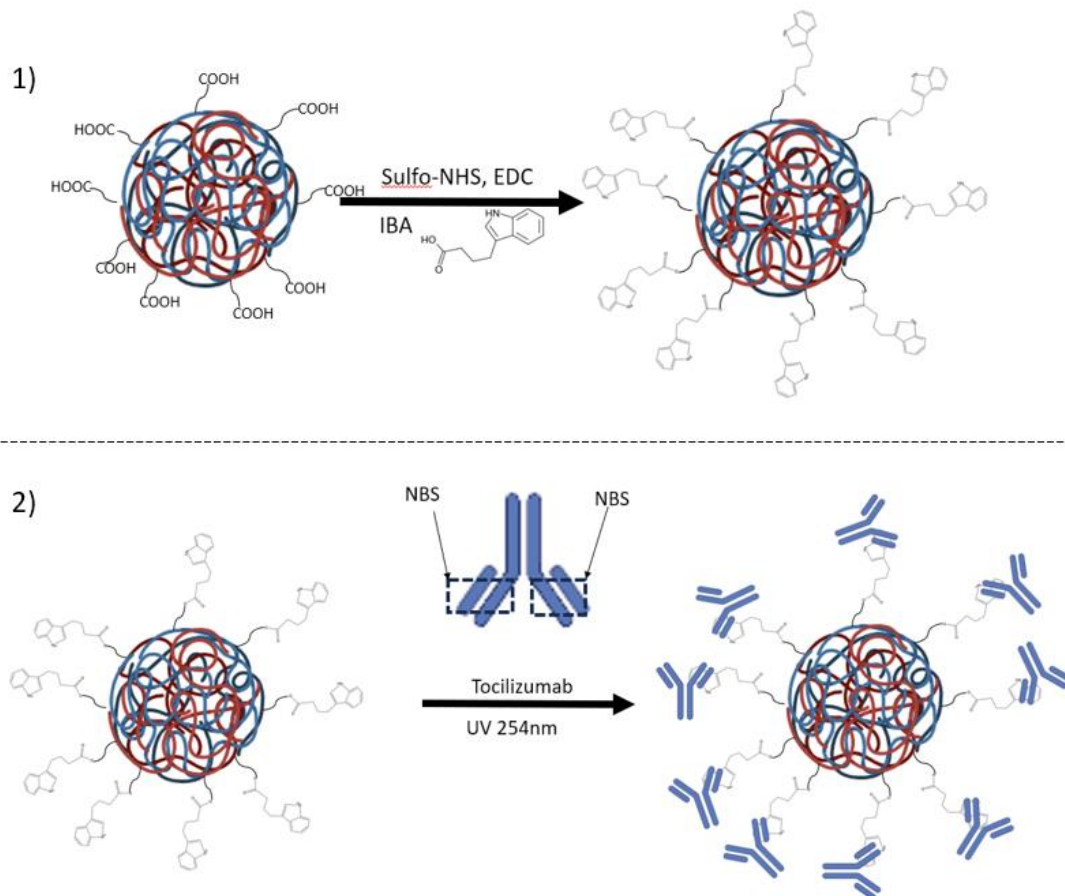


Figura 7 – Representação da reação de adsorção química utilizando Ácido Indol 3-Butírico e Luz Ultravioleta

2.6 Comentários finais

A artrite reumatoide é uma doença que erode a qualidade de vida dos enfermos ao longo dos anos, tanto pela progressão da doença quanto pelos efeitos adversos dos medicamentos que são empregados de forma sistêmica.

A capacidade dos medicamentos da classe de Anticorpos Conjugados (AC) diminuir os efeitos indesejados da quimioterapia, que é empregada de forma sistêmica, em pacientes com câncer, sem reduzir o poder terapêutico, se mostra como característica interessante no tratamento de outras doenças que utilizam de medicamentos com ação sistêmica e efeitos colaterais dose-dependente. A aplicação de ACs no tratamento de artrite reumatoide ainda é um cenário relativamente inexplorado, com um vasto mercado ainda não desbravado, e os métodos de conjugação de anticorpos devem ser estudados

caso a caso, uma vez que a estrutura e composição destes varia entre os mAbs comercialmente disponíveis.

Nesse sentido, este estudo investiga quatro possíveis métodos de conjugação entre o anticorpo monoclonal Tocilizumab, e uma nanopartícula biocompatível que possa ser empregada para realizar o encapsulamento de medicamentos, no intuito de contribuir no desenvolvimento da tecnologia de medicamentos do tipo de Anticorpos Conjugados e futuramente prover melhor tratamento para os acometidos por doenças em que esta tecnologia seja aplicável.

Como nanopartícula biocompatível, neste trabalho foram utilizadas três nanopartículas poliméricas, Poli(Metacrilato de Metila), Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Acrílico), e Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Metacrílico). A seleção dos constituintes das nanopartículas poliméricas foi feita pela propriedade adequada desses sistemas para aplicações biomédicas e farmacêuticas, boa escalabilidade. Ademais, o grupo de pesquisa já possui vasta experiência na produção dessas nanopartículas com os tamanhos adequados para este tipo de aplicação. Por essa razão, protocolo de polimerização foi selecionado a partir dos resultados e conhecimento interno, enquanto a adição dos co-polímeros, Ácido Metacrílico e Ácido Acrílico, têm como objetivo a introdução de grupamentos do tipo carboxílico, com o intuito de fornecer uma região adequada para a formação de ligações químicas nas rotas de adsorção química e interação eletroestática na rota de adsorção física. A estrutura dos polímeros pode ser observada na Figura 8 (LORCA *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016; MALHADO *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2019; Way *et al.*, 2019; MATTOS *et al.*, 2023).

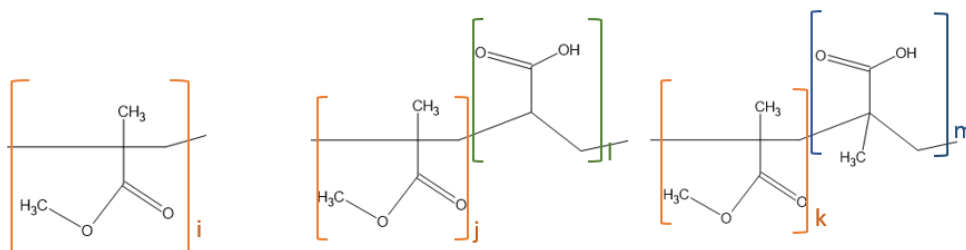


Figura 8 – Representação da estrutura química dos polímeros Poli(Metacrilato de Metila), Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Acrílico) e Poli(Metacrilato de Metila-co-Ácido Metacrílico), respectivamente.

No que diz respeito às estratégias de adsorção escolhidas, foram selecionadas técnicas descritas na literatura já aplicadas para imobilização dessa classe de biomoléculas, permitindo comparar o desempenho entre elas e selecionar a mais adequada para o anticorpo escolhido.

A técnica de adsorção física foi escolhida por ser simples e, em estudos recentes, mostrou-se eficiente em adsorver biomoléculas à nanopartículas biocompatíveis e baixa taxa de dessorção (MATTOS, 2021). Enquanto a utilização de Sulfo-NHS e EDC já é uma técnica bem descrita na literatura e já possui estudos in-vivo (MATTOS, 2021; CHEN *et al.*, 2020). A utilização de biotina e estreptavidina também é bem descrita na literatura para a imobilização de biomoléculas, porém é voltada para o desenvolvimento de biossensores (THIRAMANAS *et al.*, 2013). Por fim, a utilização do Ácido Indol 3-Butírico, em conjunto com a luz ultravioleta, vêm sendo estudada por um grupo de pesquisa para conjugar anticorpos à outras moléculas enquanto não há perda de atividade das biomoléculas, porém polímeros não foram avaliados nesses ensaios (ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013a, 2013b; ALVES *et al.*, 2014; ALVES, 2019).

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Para a produção de nanopartículas poliméricas foram utilizados os seguintes reagentes, sem qualquer outro procedimento adicional realizado:

- Metacrilato de metila monomérico (MMA), com pureza mínima de 99,5%, oriundo da Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- Ácido acrílico monomérico (AA), com pureza mínima de 99%, oriundo da Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- Ácido metacrílico monomérico (MAA), com pureza mínima de 99%, adquirido da Merck (Alemanha);
- Surfactante dedocil sulfato de sódio (SDS), com 10% de água e pureza mínima de 99%, adquirido através da Vetec Química Fina (Brasil);
- Persulfato de Potássio (KPS), utilizado como iniciador, com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil);
- Bicarbonato de sódio PA, utilizado como agente tamponante e apresentando 99,7% de pureza mínima, adquirido da Proquimios (Brasil);
- N-hexadecano PA, agente co-estabilizante, com pureza mínima de 99,5%, fornecido pela Vetec Química (Brasil);
- Agente paralisante da polimerização, hidroquinona, com 99% de pureza mínima, adquirido através da Vetec Química (Brasil).

Para a conjugação dos anticorpos monoclonais foram utilizados os seguintes reagentes:

- Tocilizumab foi adquirido na forma comercialmente disponível, o Actemra®, na concentração de 80mg/4mL, fornecido pela Roche (Suíça);
- Fosfato de sódio dibásico PA, para produção de solução fosfato, com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico PA, também para produção de solução tampão fosfato, com pureza mínima de 99%, adquirido através da Vetec Química Fina (Brasil);

- Biotina, apresentando pureza mínima de 99%, fornecido pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- Estreptavidina liofilizada, obtida de *Streptomyces avidinii*, livre de sais adquirida da Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- N-Hidroxissulfosuccinimida (NHS), pureza mínima de 98%, fornecido pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), pureza mínima de 97%, fornecido pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- Ácido Indol-3-Butírico adequado para cultivo de células vegetais, com pureza mínima de 98%, fornecido pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América);
- Dimetilsulfóxido (DMSO), com pureza mínima de 99.5%, adequado para cultivo de células vegetais, fornecido pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América).

Quanto às caracterizações, os materiais utilizados foram:

- Tetrahidrofurano, para solubilização dos polímeros e subsequente caracterização das massas molares, apresentando grau de pureza padrão HPLC, fornecido pela Tedia Inc (Brasil);
- Kit de análise de quantificação de proteínas através do método BCA Pierce, fornecido pela Thermofisher (Estados Unidos da América).

3.2 Equipamentos

Para a produção das nanopartículas biocompatíveis, ou seja, reações de polimerização, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Reator de vidro encamisado, capacidade de trabalho máxima de 1L, com agitador mecânico, termopar e condensador.
- Balança analítica da Bel Engineering (Itália), modelo U210A.
- Estufa com recirculação de ar, da Quimis (Brasil).
- Homogeneizador de alta pressão em escala de bancada, modelo 102C(CE), fornecido pela Branson Ultrasonics (Estados Unidos da América).

Para os ensaios de conjugação entre anticorpo e nanopartículas foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica, da Mettler Toledo (Estados Unidos da América), modelo XS-64;

- Balança analítica, modelo XS4002S, fornecido pela Mettler Toledo (Estados Unidos da América);
- Agitador da Scientific Industries (Estados Unidos da América), modelo Roto-Shaker Genie SI-1100;
- Centrifuga Centrifuge 5810R, adquirido através da Eppendorf (Alemanha);
- pHmêtro modelo W3B da Bel Engineering (Itália);
- Membrana de filtração feita de Polietersulfona, modelo Amicon Bioseparations Biomax, de 500 kDa, fabricada pela Millipore (Estados Unidos da América);
- Célula de ultrafiltração agitada, modelo 8010, fabricada pela Millipore (Estados Unidos da América);
- Célula de ultrafiltração por centrifugação, modelo Amicon Ultra Ultracel de 3kDa, fabricado pela Millipore (Estados Unidos da América);
- Célula de ultrafiltração por centrifugação, modelo Vivaspin 2 VS0251 de 300kDa, produzida pela Sartorius AG (Alemanha);
- Lanterna de emissão de radiação ultravioleta, modelo BOIT-LUB01, adquirido através da BOITTON Instrumentos (Brasil).

Para as caracterizações realizadas nesse trabalho, foram utilizados os equipamentos:

- TGA Q-500, Discovery Series, fornecido pela TA Instruments (Reino Unido), para análise termogravimétrica;
- Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), modelo IRTracer-100, fornecido pela Shimadzu (Japão), com o acessório QATR 10;
- Calorímetro diferencial de varredura (DSC), modelo Q-2000, adquirido da TA Instruments (Reino Unido);
- Cromatógrafo de permeação em gel (GPC), modelo Viscotek GPC Max VE 2001, fornecido pela Malvern Panalytical (Reino Unido). O cromatógrafo é equipado com detector refratométrico VE 3580, também da Malvern, e conjunto de colunas lineares, modelos KF-805L e KF-48804L, fornecidas pela Shodex (Japão);
- Analisador de tamanhos de partícula e potencial zeta, modelo ZetaSizer Nano ZS, da Malvern Panalytical (Reino Unido);
- Espectrofotômetro Uv-Vis Nanodrop One, fabricado pela ThermoFisher Scientific (Estados Unidos da América);
- Microscópio Eletrônico de Varredura e Transmissão VEGA-3 LMU fabricado pela TESCAN (República Tcheca);

- Metalizador de amostras (Au/C) Desk V HP da Denton Vacuum (Estados Unidos da América).

3.3 Métodos

3.3.1 Produção de nanopartículas poliméricas

Neste estudo, foram utilizadas três nanopartículas diferentes. O monômero base utilizado foi o metacrilato de metila (MMA). Os co-monômeros foram o ácido acrílico (AA) e o ácido metacrílico (MAA), em uma proporção de 10% em relação à massa total utilizada para a polimerização de poli(metacrilato de metila) puro, sendo produzidos então poli(metacrilato de metila) (P(MMA)), Poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (P(MMA-co-AA)) e poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) (P(MMA-co-MAA)).

A seleção deles se baseou nas suas características adequadas para introduzir grupos ácidos na superfície das nanopartículas e pela experiência prévia existente no grupo de pesquisa. Portanto, a determinação dos parâmetros experimentais e do procedimento foi feita à luz das pesquisas de LORCA *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2019; MATTOS *et al.*, 2023.

O método escolhido para a produção dessas nanopartículas foi a polimerização em miniemulsão, com uma emulsão do tipo óleo em água (O/A). Três soluções distintas foram preparadas, a saber: uma solução (1), correspondente à fase aquosa, diluindo o surfactante dodecil sulfato de sódio e bicarbonato de sódio em água destilada, mantendo agitação magnética por 20 minutos; outra solução (2), correspondente à fase oleosa, composta por hexadecano e monômeros, sob agitação magnética por 10 minutos e; a última solução (3) era composta pelo iniciador, o persulfato de potássio (KPS), solubilizado em água destilada, sob agitação magnética por 10 minutos, com as quantidades mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das soluções utilizadas na produção das nanopartículas poliméricas

Solução	Reagente	Massa (g)	Material
1	Água	364,88	Béquer 500mL
	Dodecil sulfato de sódio	4,94	
	Bicarbonato de Sódio	0,40	
2 (PMMA)	Metacrilato de metila	98,72	Béquer 500mL
	Hexadecano	0,40	
2 (P(MMA-co-AA))	Metacrilato de metila	88,85	Béquer 500mL
	Ácido acrílico	9,87	
	Hexadecano	0,40	
2 (P(MMA-co-MAA))	Metacrilato de metila	88,85	Béquer 500mL
	Ácido metacrílico	9,87	
	Hexadecano	0,40	
3	Água	30,00	Béquer 50mL
	Persulfato de potássio	0,49	

Após os reagentes estarem devidamente solubilizados, a solução 1 foi vertida na solução 2, sob agitação magnética, obtendo-se uma pré-emulsão. Esta foi, então, submetida à pressão de 400 bar no homogeneizador de alta pressão, resultando em uma emulsão de óleo em água. A Figura 9 ilustra o processo reacional.

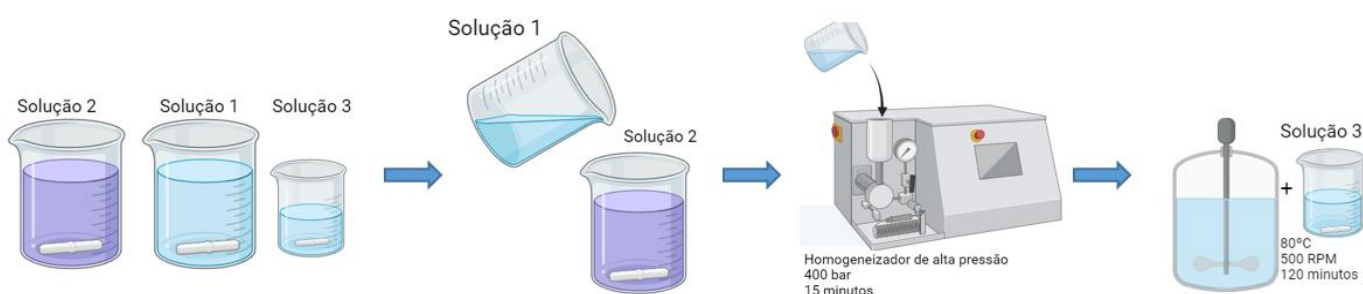


Figura 9 – Esquemática da reação de polimerização. Primeiramente são produzidas as soluções 1, 2, e 3. A solução 1 é vertida na solução 2 sob agitação mecânica, que é então submetida a 400bar de pressão por 15 minutos no homogeneizador de alta pressão. O conteúdo é então vertido no reator de vidro encamisado, e ao atingir 80°C, a solução 3 é vertida para iniciar a reação, que dura 120 minutos com agitação constante a 500 rpm.

Essa emulsão de óleo em água foi vertida em um reator de vidro de 1L, encamisado, com o fluido de aquecimento ajustado para a temperatura de 80°C, previamente aquecido. Esse reator possuía uma tampa metálica com 5 bocas, onde foram acoplados um termopar, agitador mecânico ajustado para 500 rpm e condensador, enquanto as duas bocas remanescentes permaneciam fechadas, conforme mostra a Figura 10.

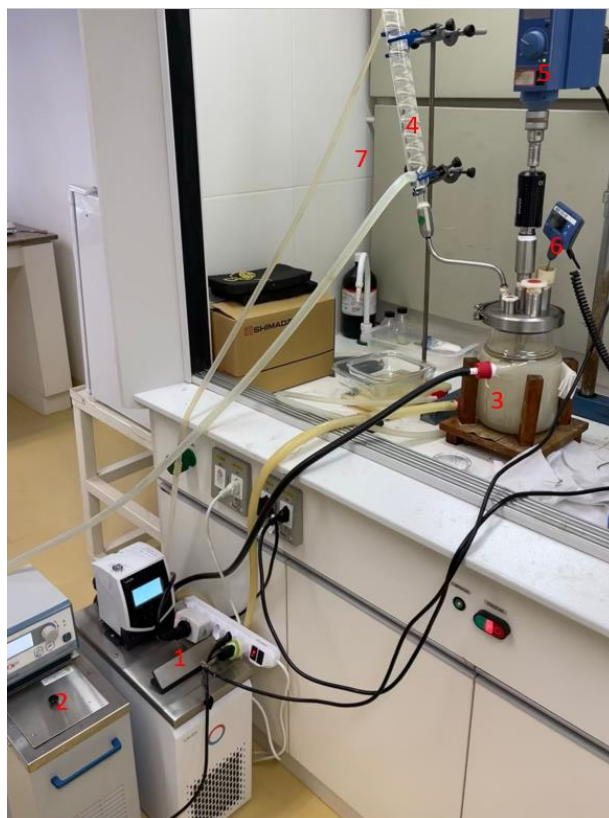


Figura 10 – Sistema utilizado para a síntese das nanopartículas. (1) Controlador de temperatura do fluido do reator. (2) Controlador de temperatura do fluido do condensador. (3) Reator de 1L encamisado e fabricado em vidro, com tampa metálica de 5 bocas. (5) Agitador mecânico funcionando configurado para funcionar a 500 rpm. (6) Termopar utilizado para monitorar a temperatura do meio reacional. (7) Capela com exaustão.

Quando o conteúdo do reator chegou aos 80°C, a solução 3, que continha o iniciador, foi despejada no reator, demarcando o início da reação de polimerização. Ao longo da reação, uma das bocas era aberta, a fim de recolher uma alíquota em tempos pré-determinados, com a finalidade de realizar a análise de conversão por gravimetria e, então, fechada novamente. As alíquotas eram despejadas em forminhas de alumínio de peso conhecido, contendo 0,15 mL de uma solução de Hidroquinona 1% (m/m). Decorridos o tempo de reação de duas horas, se realizou o resfriamento do reator e se obteve as nanopartículas na forma de um látex branco, armazenados em recipientes de vidro, ao abrigo de luz em temperatura ambiente.

3.3.2 Caracterização das nanopartículas

Análises da conversão da polimerização por gravimetria, distribuição de massas molares, identificação da ligação dos átomos de hidrogênio, da morfologia, do potencial

eletrocinético e tamanho das partículas, e análises térmicas foram conduzidas no látex resultante.

3.3.2.1 Conversão gravimétrica

Alíquotas de 2mL foram coletadas durante as reações nos tempos referentes a 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos, sendo armazenadas em formas de alumínio de massa conhecida, contendo 0,15mL de solução aquosa de hidroquinona, um agente que causa a paralização da reação ao inativar os radicais livres, na concentração de 1% massa/massa, e tinham seu peso aferido imediatamente.

As amostras eram secadas em uma estufa com recirculação de ar, na temperatura de 25°C, até que uma massa constante fosse atingida, indicando a evaporação de todo o conteúdo aquoso. A conversão pode ser então determinada através de análise gravimétrica, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Conversão (\%)} = \left(\frac{M_{seco} * M_{total}}{(M_{aliquota} * M_{fase\ org\ânica})} \right) * 100$$

Equação 1 – Equação utilizada para calcular a taxa de conversão dos monômeros em polímero, sendo M_{seco} referente a massa da amostra ao atingir peso constante, $M_{aliquota}$ referente a massa de alíquota no momento da reação, enquanto as outras duas, M_{total} e $M_{fase\ org\ânica}$, são referentes as massas de reagentes totais e de reagentes presentes somente na fase orgânica, respectivamente.

3.3.2.2 Potencial eletrocinético e distribuição de tamanho de partículas

Para verificar que as partículas produzidas possuíam tamanho adequado para a aplicação desejada - menores que 80 nanômetros, e em suspensão estável, foram feitas análises a respeito do tamanho de partícula e do potencial eletrocinético, também conhecido como potencial zeta, com o equipamento ZetaSizer NanoZS, da Malvern Panalytcs.

O potencial zeta é o potencial medido no plano de cisalhamento de uma superfície carregada, podendo ser calculado através de uma relação teórica entre a mobilidade eletroforética, viscosidade e constante dielétrica do líquido dispersante, através de a equação 2. Potenciais zeta com módulos de valores elevados tendem a indicar uma menor propensão a aglomeração e maior estabilidade da suspensão (CLOGSTON, PATRI, 2011; SURI *et al.*, 2013; GHERNAOUT, 2015).

$$U_e = \frac{2 * \epsilon * z * f(k\alpha)}{3\eta}$$

Equação 2 – Equação conhecida como equação de Henri, sendo empregada no equipamento para determinação do potencial zeta, sendo U_e correspondente à mobilidade eletroforética, z é o potencial zeta, ϵ é a constante dielétrica e η a viscosidade do líquido dispersante, enquanto $f(k\alpha)$ é a função de Henri.

Análises de potencial zeta foram feitas utilizando 1mL de amostra diluída em 10mL de água, que foi então inserida em uma cubeta de modelo DTS1070. Como parâmetros adotados, foi considerado o índice de refração do PMMA medido anteriormente (1,476), a água como meio dispersante, com constante dielétrica de 78,5 e índice de refração de 1,330, temperatura de 25°C, com tempo de calibração de 60 segundos. Foram realizadas 25 corridas em triplicata.

As medições de tamanho das nanopartículas foram feitas imediatamente após o resfriamento do conteúdo do reator, sendo utilizados 0,15mL de amostra, diluídos em 2mL de água. O conteúdo é então inserido em uma cubeta de vidro e levada até o equipamento, com parâmetros já definidos para as análises. Os parâmetros levam em conta o índice de refração polímero (1,476), temperatura da análise (25°C) e número de leituras, neste caso foram 10 corridas de 10 segundos de cada amostra, em triplicatas. Como índice de refração do polímero, uma vez que as amostras são constituídas majoritariamente de metacrilato de metila, foi considerado o valor referente a PMMA puro, medido anteriormente.

O tamanho das partículas é feito através do uso do espalhamento dinâmico da luz, conhecido como DLS (sigla em inglês de *Dynamic Light Scattering*), que utiliza a equação de Stokes-Einstein (Equação 3) para determinar o tamanho das partículas em suspensão, a partir do movimento Browniano e do modelo da esfera difusa. Moléculas de tamanhos diferentes se movimentam em velocidades diferentes inversamente proporcional ao seu tamanho: moléculas menores se movimentam mais rapidamente, enquanto moléculas maiores se movimentam mais lentamente. Portanto, quanto menor a partícula, maior sua velocidade de difusão (SWITALSKI *et al.*, 2022).

$$D = \frac{K_B * T}{6 * \pi * R_H * \eta}$$

Equação 3 – Equação de Stokes-Einstein, utilizada pelo equipamento para determinar o diâmetro das nanopartículas produzidas. K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, π é o número pi, enquanto R_H é o raio hidrodinâmico e η é a viscosidade.

Um dos fatores que indicam uma suspensão estável, como mencionado anteriormente, é a ausência da formação de aglomerados de partículas. Para validar a estabilidade, um novo ensaio foi feito 17 meses após a polimerização, com os mesmos parâmetros utilizados.

3.3.2.3 Distribuição de massas molares

Através de emprego da cromatografia de permeação em gel (GPC), foi possível determinar a distribuição das massas molares e as massas molares médias das nanopartículas produzidas. O princípio desta técnica é que moléculas menores e, portanto, com massas molares menores, penetram facilmente nas colunas cromatográficas do equipamento, enquanto massas molares maiores demoram mais tempo para eluir (GRUBISIC *et al.*, 1967; BALKE *et al.*, 1969).

Inicialmente, foi necessário realizar a dissolução do polímero com um solvente, com o uso de 9mg de cada amostra e 9 mL de tetrahidrofurano (THF). Então, as amostras foram colocadas no cromatógrafo e percorreram as colunas do equipamento, fornecendo dados relativos à massa molar z-média (Mz), massa molar numérica média (Mn), massa molar ponderal média (Mw) e índice de polidispersão, que é dado pela razão entre Mw e Mn.

O equipamento utilizado foi o Viscotek GPC Max Ve 2001, equipado com detector refratométrico VE 3580 e colunas lineares Shodex KF-805L e Shodex KF-48804L. A fase móvel foi o THF, com temperatura de 40°C e vazão de 1 mL/min. Uma curva de calibração prévia foi realizada com padrões de poliestireno com massas molares entre 5×10^3 e 106 Da.

3.3.2.4 Morfologia

As partículas foram analisadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura modelo VEGA-3 LMU, produzido pela marca TESCAN, sob tensão máxima de 25kV e alto vácuo. As amostras foram preparadas através de gotejamento em fita dupla face de carbono aderida ao suporte do equipamento e através da liofilização do látex produzido e subsequente aderência na mesma fita dupla face. Após isso, ambas foram metalizadas com Ouro, no metalizador Desk V HP da Denton Vacuum, sob baixo vácuo. Apenas as imagens do material liofilizado foram utilizadas.

3.3.2.5 Temperatura de transição vítrea

Análises térmicas podem fornecer boas indicações se houve a correta incorporação dos comonômeros nos polímeros. Uma das análises empregadas foi a calorimetria diferencial exploratória (DSC), que fornece a temperatura de transição vítrea (Tg), em um equipamento do modelo Q-2000 da TA Instruments. Foram feitas três curvas de aquecimento a 10°C/min de 0°C até 200°C, com resfriamento entre a primeira e a segunda e utilizados 5mg de amostra de cada polímero, com atmosfera de nitrogênio, com uma vazão de 50mL/min.

3.3.2.6 Temperatura máxima de degradação

Outra análise térmica empregada foi a análise termogravimétrica, a fim de avaliar a temperatura máxima de degradação dos polímeros produzidos. Utilizou-se em torno de 12mg de amostra e a análise foi feita de 25°C até 800°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min. A atmosfera da análise foi de gás nitrogênio, com uma vazão de 60mL/min. O equipamento usado foi um TGA Q-500 da TA Instruments.

3.3.3 Ensaios de conjugação de anticorpos a nanopartículas

Buscou-se avaliar diferentes métodos de conjugação das nanopartículas biocompatíveis a um anticorpo monoclonal humanizado. Neste estudo, a escolha foi o Tocilizumab, devido à relevância atual do anticorpo monoclonal e disponibilidade, em sua forma comercial Actemra®, na concentração de 80 mg / 4 mL. A solução foi diluída para 1mg / mL, e a quantidade utilizada em cada ensaio foi padronizada a 100µg, com um volume fixo de 1,6mL, nos dando uma concentração padrão de 62,5µg / mL em todos os ensaios. A escolha se deu baseada na literatura disponível, que demonstra ser uma quantidade suficiente para realizar o recobrimento de nanopartículas de tamanho similar.

Quatro estratégias diferentes foram escolhidas, sendo a adsorção física o primeiro, e, subsequentemente, três diferentes quimissorções. Para as quimissorções foram selecionados o Sulfo-NHS + EDC para o primeiro ensaio, o Ácido Indol-3-Butírico para o segundo e, por fim, a Biotina e Estreptavidina.

Necessitou-se da produção de uma solução tampão de fosfato com pH 6,0 e concentração 0,1M. Essa solução é a final da mistura de outras duas soluções: uma com 1,42g de fosfato de sódio dibásico em 50 mL de água destilada e outra com 6,00g de fosfato de sódio monobásico em 250 mL de água destilada. Para o preparo da

solução final foram misturados 250 mL de água destilada, 30,75mL da primeira solução e 219,25 mL da solução 2, apresentando pH 6,0, verificado através do pHmêtro W3B da Bel Engineering, e armazenada em recipiente de vidro e refrigerado a 4°C (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição de soluções no processo de produção da solução tampão fosfato de pH 6,0

Solução	Reagente	Massa (g)
1	Água	50,00
	Fosfato de sódio dibásico	1,42
2	Água	250,00
	Fosfato de sódio monobásico	6,00
3	Solução 1	30,75
	Solução 2	219,25

Com o intuito de eliminar contaminantes extras presentes no látex (forma como as nanopartículas se apresentam ao final da reação de polimerização), que pudessem interferir na conjugação, se realizou uma etapa de lavagem com 1,5mL da solução tampão e 0,1mL do látex, antes dos ensaios de adsorção, incubando-as por 2 h a 20 RPM, em um agitador Roto-Shake Genie SI-1100, da Scientific Industries. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado em centrífuga Eppendorf 5810R a 6000 RPM por 30 minutos com uma célula de ultrafiltração Amicon de 3 kDa, de acordo com a Figura 11. O conteúdo foi ressuspenso, baseado no protocolo de cada ensaio de adsorção.

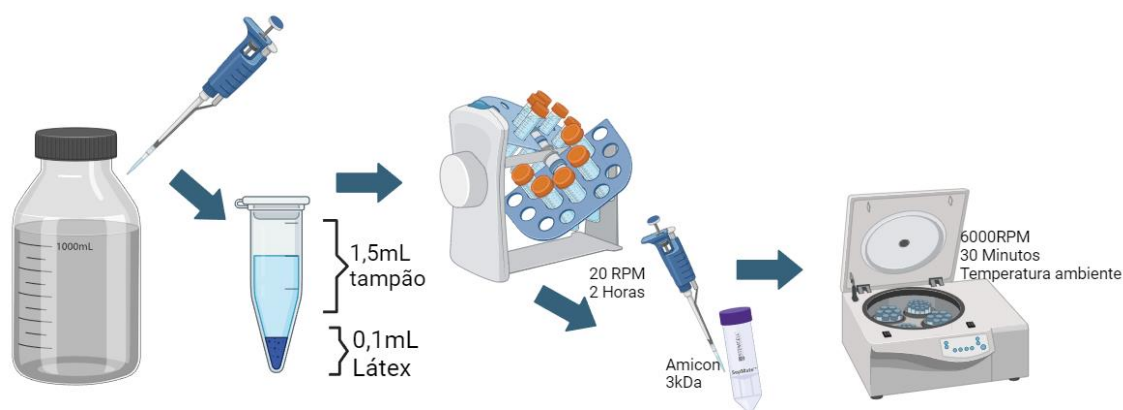


Figura 11 – Esquemática do procedimento de lavagem, feito antes de todos os ensaios de adsorção. Eram misturados, em um Eppendorf, 1,5mL de solução tampão e 0,1mL do látex. Após 2 horas de incubação a 20RPM o látex era filtrado em uma célula de filtração Amicon de 3kDa, com o auxílio de uma centrífuga Eppendorf 8510R

3.3.3.1 Adsorção física

Para a realização desse ensaio, após a etapa de lavagem das nanopartículas, 1,5 mL de tampão era utilizado para ressuspender as nanopartículas e, então, adicionadas a um Eppendorf, juntamente com 0,1 mL da solução diluída de Actemra®, e incubadas por 2 horas a 20 RPM no mesmo agitador mecânico.

Tabela 3 – Tabela indicando a quantidade e concentração de cada solução utilizada nos ensaios de adsorção física, além dos parâmetros do experimento.

Solução	Reagentes	Concentração	Quantidade	Parâmetros
1	NPs em Fosfato	0,1M	1,5 mL	20 RPM
2	Tocilizumab	1g/mL	0,1 mL	120 minutos

Para a etapa de filtração, foi selecionada uma membrana com capacidade de separar o Tocilizumab não adsorvido do restante das partículas, no caso a membrana de Biomax de 500kDa da Millipore, que era acoplada à uma cápsula de ultrafiltração agitada Amicon 8010. Como o volume de trabalho mínimo dessa cápsula é de 2mL, era feita uma diluição de 5 para 1, e a filtração realizada sob atmosfera de nitrogênio a 5 bar e 200 RPM, condições utilizadas em todas as outras estratégias. Ao final, ambos filtrados e retidos eram armazenados em tubos falcon e sob refrigeração para análises posteriores, como ilustrado pela Figura 12.

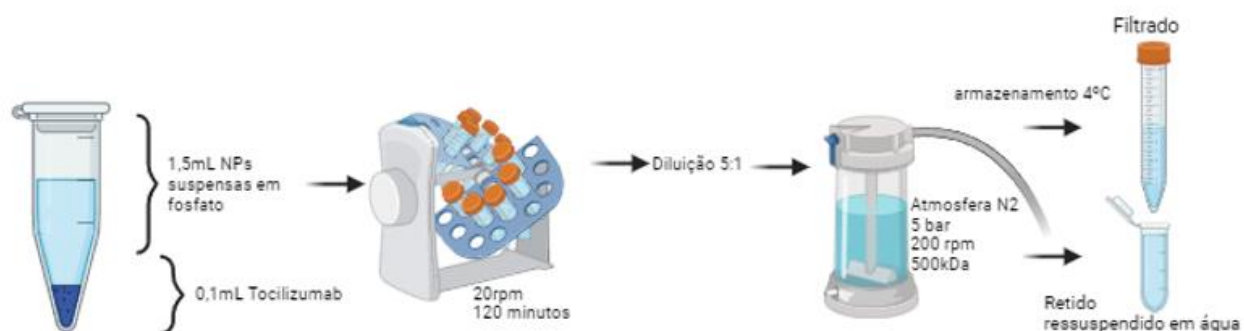


Figura 12 – Esquematização do ensaio de adsorção física, com início após a ressuspensão das nanopartículas retidas na membrana amicon de 3kDa. Incuba-se as nanopartículas ressuspensas com 100µg Tocilizumab por 2h a 20rpm, depois realiza-se a filtração sob atmosfera de N2 pressurizada. Retido e filtrado são armazenados a 4°C.

3.3.3.2 Adsorção química com Sulfo-NHS e EDC

A quimissorção, como mencionado anteriormente neste trabalho, se baseia na formação de uma ligação co-valente entre biomolécula, neste caso o Tocilizumab, e adsorvente, as nanopartículas poliméricas, através de uma reação química. Foram utilizadas três estratégias de imobilização química diferentes, sendo esta primeira baseado na modificação do protocolo utilizado por Chen et al para conjugar Tocilizumab a um polímero, como ferramenta diagnóstica para artrite reumatoide, do protocolo utilizado previamente no grupo para imobilização de outras biomoléculas as nanopartículas utilizadas nesse trabalho e do trabalho publicado Thiramanas et al, imobilizando anticorpos a superfície polimérica (THIRAMANAS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2020; MATTOS *et al.*, 2023).

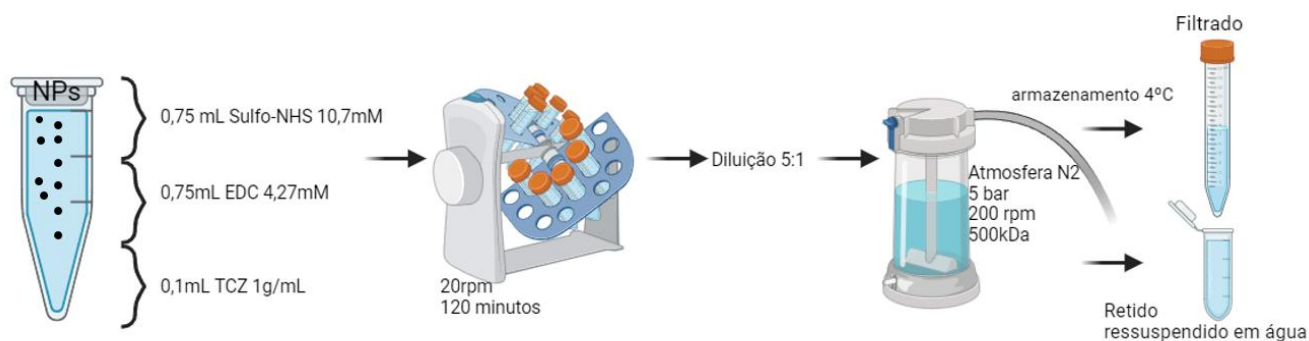


Figura 13 – Esquemática do ensaio de adsorção química com Sulfo-NHS e EDC. Após a lavagem, as nanopartículas são ressuspenso utilizando 0,75mL de cada solução e incubadas com 100µg de TCZ por 2h a 20rpm. Após isso, é realizada a filtração sob 5bar de N₂ e 200 rpm, membrana de 500kDa. O retido é ressuspenso em 1,5mL de água e armazenado com o filtrado à 4°C.

Para a realização desta primeira estratégia de imobilização, foram produzidas duas soluções de fosfato, uma com EDC com concentração de 4,27mM e outra com 10,70mM Sulfo-NHS. Para a ressusensão após a etapa de lavagem, era utilizada uma solução de 1,5mL, composta de 0,75mL de cada solução supracitada, resultando em uma solução final com 2mM EDC e 5mM Sulfo-NHS. Ao final do processo de ressusensão, foi adicionado 0,1mL da solução de Actemra® 1mg/mL, incubando por 2 horas a 20 rpm. Ao final deste período de tempo, era realizada a diluição 5:1 e filtrado na mesma membrana, capsula, e condições da adsorção física. Novamente, filtrado e retido foram armazenados em recipientes plásticos e mantidos refrigerados para futuras análises (Tabela 4, Figura 13).

Tabela 4 – Esquematização de todas as soluções envolvidas no processo de adsorção química 1

Solução	Componentes	Concentração	Quantidade	Parâmetros
1	Fosfato Sulfo-NHS	0,1M	500 mL	120 minutos 20 rpm temperatura ambiente
		10,7mM	0,464 g	
2	Fosfato EDC	0,1M	500 mL	
		4,27mM	1,026 g	
3	Solução 1	5mM	0,75 mL	
	Solução 2	2mM	0,75 mL	
4	Tocilizumab	1mg/mL	0,1 mL	

3.3.3.3 Adsorção química com Ácido Indol-3-Butírico (IBA)

Esta estratégia de adsorção foi baseada no método descrito em diversos trabalhos divulgados por Alves et al, com algumas modificações a fim de padronizar-se a quantidade de anticorpo e nanopartículas utilizados entre as estratégias escolhidas neste trabalho. Para tanto, esta estratégia é dividida em duas partes diferentes, primeiramente ocorre a imobilização do IBA, uma biomolécula, nas nanopartículas, se utilizando da mesma estratégia utilizada na primeira rota de quimissorção. Após essa primeira etapa, é realizada uma etapa de incubação entre polímeros funcionalizados com Ácido Indo-3-Butírico e anticorpos sob incidência de luz ultra-violeta com comprimento de 254 nanômetros (ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013a, 2013b; ALVES *et al.*, 2014; ALVES, 2019).

Para este processo, foram produzidas três novas soluções utilizando o tampão fosfato. Uma de Sulfo-NHS com concentração de 16mM, uma com EDC a 6,4mM com com e uma terceira, contendo IBA na concentração de 960µM.

Tabela 5 – Lista de soluções utilizadas em cada etapa da adsorção química 2

Solução	Componentes	Concentração	Quantidade	Parâmetros
Primeira Etapa				
1	Fosfato Sulfo-NHS	0,1M	500 mL	2 horas
		16mM	1,737 g	
2	Fosfato EDC	0,1M	500 mL	20 rpm
		6,4mM	0,613 g	
3	Fosfato IBA	0,1mM	1000 mL	Temperatura ambiente
		960µM	0,195 g	
4	Fosfato	0,1M	Vide tabela 2	
5	Solução 1	5mM	0,5 mL	
	Solução 2	2mM	0,5 mL	
	Solução 3	300µM	0,5 mL	
	Solução 4	0,1M	0,1 mL	

Segunda Etapa				
6	Fosfato	0,1M	1,5mL	4 horas 20 rpm Luz UV 254nm
7	Tocilizumab	1g/mL	0,1mL	

O processo de ressuspensão das nanopartículas após a etapa de lavagem era feito utilizando uma solução de 1,6mL, composta de 0,5mL de cada solução supracitada e 0,1mL de solução fosfato pura, adicionados com a finalidade de manter o volume constante entre todos os experimentos realizados, e realizada a incubação por 2 horas a 20RPM.

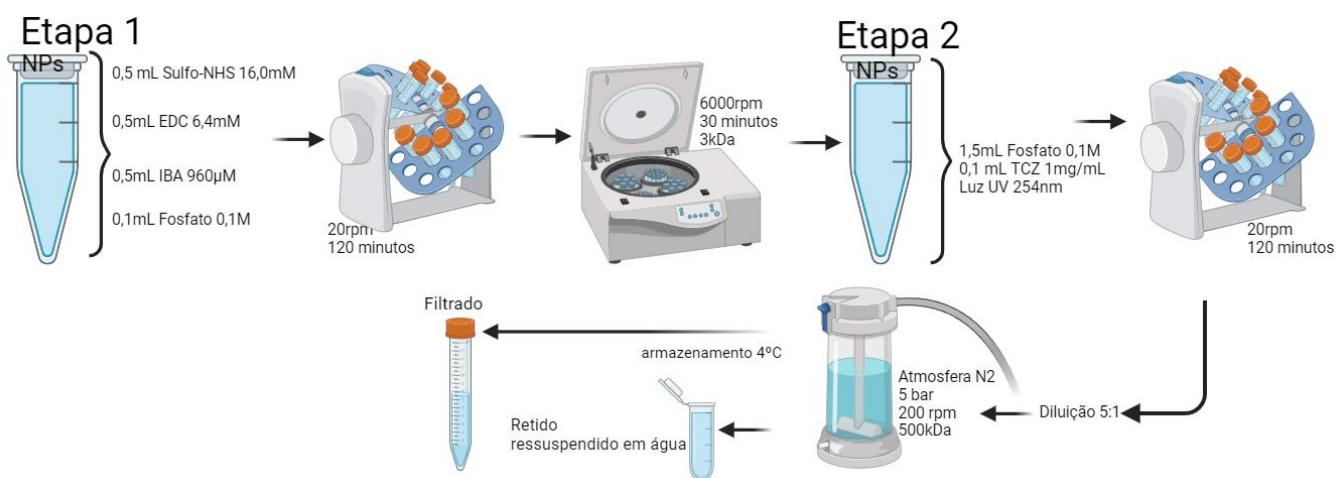


Figura 14 – Esquematização do ensaio de adsorção química com o Ácido Indol 3-Butírico.

Após esse período foi feita a centrifugação dessas nanopartículas utilizando cápsulas de ultrafiltração Amicon de 3kDa, a 6000rpm por 30 minutos e ressuspensionadas utilizando 1,5 tampão fosfato e adicionados 0,1mL da solução de Actemra e incubados por 4 horas a 20RPM em câmara escura, sob incidência constante de luz no comprimento de 254nm. Por fim, era feita uma nova filtração utilizando a cápsula de filtração pressurizada e membrana de 500kDa, com as mesmas condições já citadas, armazenando-se filtrado e retido, sob refrigeração.

Todo esse processo está ilustrado na Figura 14 e Tabela 5.

3.3.3.4 Adsorção química com Biotina e Estreptavidina (SA)

A terceira e última rota de quimissorção escolhida funciona na afinidade entre Estreptavidina e biotina. Os parâmetros para a realização deste ensaio foram escolhidos a partir do trabalho de Thiramanas et al. Para que esta fosse realizada com sucesso,

esta etapa é dividida em três partes. Primeiro é realizada a biotilação dos anticorpos, ou seja, ligação da biotina ao anticorpo. Além disso, também é necessário que seja feita a imobilização da SA nas nanopartículas poliméricas produzidas. Por fim, é realizada a última etapa, a fim de imobilizar os anticorpos biotinilados aos polímeros, através da incubação de ambos (THIRAMANAS *et al.*, 2013).

Tabela 6 – Composição das soluções utilizadas nos ensaios de adsorção com biotina e estreptavidina

Solução	Componentes	Concentração	Quantidade	Parâmetros
Primeira Etapa				
1	Dimetilsulfóxido	-	1,5 mL	4 horas 20 rpm Temp Amb
2	Tocilizumab	-	1mg	
3	Biotina DMSO	8mg/mL	0,1 mL	
Segunda Etapa				
4	Fosfato EDC	0,1M 6,4mM	500 mL 0,613 g	2 horas
5	Fosfato Sulfo-NHS	0,1M 16mM	500 mL 1,737 g	
6	Fosfato Estreptavidina	0,1M 320µg/mL	500 mL 0,160 g	20 rpm
7	Solução 4 Solução 5 Solução 6 Fosfato	2mM 5mM 100µg/mL 0,1M	0,5 mL 0,5 mL 0,5 mL 0,1 mL	Temperatura Ambiente
Terceira Etapa				
8	TCZ biotinilado	1mg/mL	0,1mL	2 horas 20 rpm Temp Amb
9	Fosfato	0,1M	1,5 mL	

A primeira etapa é iniciada com a diluição de 1mg de Tocilizumab 1mg/mL em 10mL de solução tampão e realizada a filtração, utilizando a célula amicon de 3kDa, a 6000rpm por 30 minutos. Os anticorpos, que ficaram retidos na membrana, eram então ressuspendidos com 1,5mL de DMSO e transferidos para um eppendorf, onde é adicionada uma solução de 0,1mL DMSO e biotina com concentração de 8mg/mL, resultando em uma proporção de 80µg de biotina por mg de mab e 1,6mL de volume total. Ambos eram incubados por 4horas a 20 RPM. Após esse período, era realizada a filtração utilizando-se da membrana de 3kDa, nas mesmas condições. Após a ressusensão em 1mL de tampão fosfato, o conteúdo foi mantido armazenado em criotubo na geladeira para a realização de todos os ensaios subsequentes.

Na segunda etapa, é feita a imobilização, nas nanopartículas, da Estreptavidina, uma proteína que é secretada pela bactéria *Streptomyces avidinii*, que é então purificada e fornecida pela Sigma-Aldrich. Este procedimento foi realizado utilizando

novamente três soluções: Uma de EDC dissolvido em tampão fosfato, na concentração de 6,4millimolar, uma de Sulfo-NHS e tampão fosfato, a 16mM. Uma terceira solução de Estreptavidina dissolvida em tampão fosfato foi produzida, na concentração de 320µg/mL. Para a realização dos ensaios, as nanopartículas, após a lavagem, foram incubadas com 0,5mL de cada solução, mais a adição de 0,1mL de tampão puro, por 2 horas a 20rpm. Após a realização da conjugação, foi feita a filtração, a fim de retirar todo o material não conjugado nas nanopartículas, em células pressurizadas de ultrafiltração amicon, com membranas biomax de 500kDa, a 5 bar de nitrogênio e 200rpm. O material foi ressuspendido em 1,5mL da solução tampão e imediatamente submetido a terceira e última etapa (Figura 15, Tabela 6).

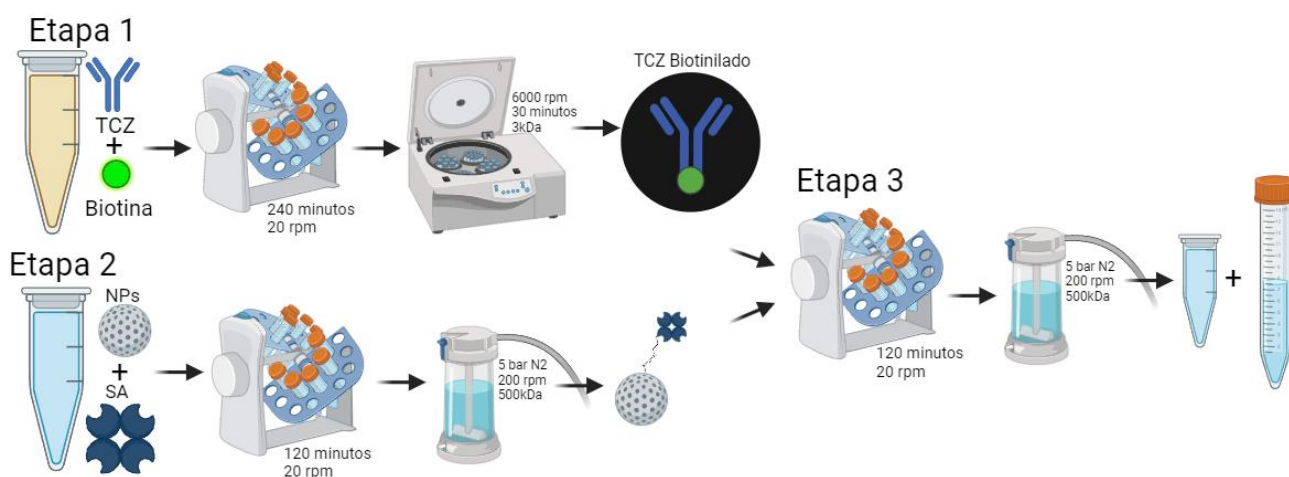


Figura 15 – Esquematização das etapas realizadas no ensaio de adsorção química utilizando estreptavidina e biotina.

Na terceira e última etapa deste ensaio, ao material ressuspendido foram adicionados 0,1mL da solução de Tocilizumab biotinilado. Como esta ligação por afinidade ocorre de forma espontânea, a incubação ocorre, sem adição de outros reagentes, por 2 horas a 20rpm. O material então é filtrado utilizando o mesmo processo de ultrafiltração sob atmosfera pressurizada de gás nitrogênio e membrana de 500kDa. Ambos filtrado e retido foram armazenados em recipientes plásticos, sob refrigeração.

3.3.4 Análise quantitativa da adsorção

3.3.4.1 Análise de eficiência de adsorção

Para validar as estratégias de adsorção, durante as etapas de filtração foram armazenados tanto os retidos quanto filtrados na última etapa de filtração de cada estratégia. Como as membranas escolhidas não permitem a passagem de nanopartículas, apenas os anticorpos não ligados aos polímeros eluem no conteúdo filtrado e, então, quando quantificadas as proteínas presentes, apenas os anticorpos não ligados são contabilizados. A partir dessa informação, como a quantidade de anticorpo adicionada é conhecida, é possível realizar o cálculo para que as eficiências de adsorção sejam conhecidas.

Como método de quantificação, foi utilizado o equipamento Nanodrop One, produzido pela ThermoFisher Scientific (Estados Unidos da América), com a metodologia IgG A280, que assume um tamanho médio para IgG de 150kDa e calcula a concentração a partir do coeficiente de extinção mássica de $210,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Neste equipamento, o tampão fosfato foi utilizado como baseline e, então, uma gota do filtrado é pipetada no sensor para medição.

3.3.4.2 Análise de dessorção

Ao realizar adsorções físicas e químicas, é possível que partículas que apresentem interações mais fracas dessorvam. Para a maioria das aplicações, esse é um evento indesejável, portanto, para determinarmos a qualidade das adsorções, foram feitos testes de dessorção.

Por razão do quantitativo de amostra, apenas as amostras referentes às partículas P(MMA-co-MAA) foram analisadas. Neste processo, foram utilizadas células de ultrafiltração da Sartorius de 300kDa modelo VS0251, centrifugadas utilizando a centrífuga 5810R, da marca Eppendorf, a 6000 RPM por 30 minutos. Foram realizadas três lavagens, com a mesma solução tampão fosfato utilizadas nos ensaios de adsorção, de cada amostra e o filtrado coletado após cada lavagem. A quantificação foi realizada utilizando o mesmo método das adsorções, através do Nanodrop One com a metodologia IgG A280.

3.3.5 Análise qualitativa de adsorção

3.3.5.1 Análise por FTIR

A técnica de espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é baseada na emissão de frequências de ondas na região do infravermelho, a luz é então absorvida pelas moléculas e a energia induz uma alteração no momento dipolar através da vibração nas ligações químicas que absorvem o feixe específico. O equipamento é então capaz de detectar e quantificar tal absorção e produzir gráficos com picos relativamente estreitos para cada ligação (MOVAGASHI *et al.*, 2008; PAVIA *et al.*, 2009)

As amostras foram caracterizadas no estado líquido, fazendo uso de um FTIR modelo IR-Tracer 100 da Shidmazu (Japão), com o auxílio do acessório ATR QATR-10, também da Shidmazu. Para cada amostra foram utilizadas 32 varreduras, das quais eram obtidas um valor médio, das regiões entre 4000 e 400 cm^{-1} e resolução de 1 cm^{-1} .

Através da comparação dos espectros das amostras não somente pré e pós adsorção, contendo polímeros e biomoléculas puras, mas também entre cada etapa de adsorção (nos casos em que são feitas várias etapas), pode-se observar ou não se houve a correta funcionalização das biomoléculas nos polímeros.

3.3.5.2 Análise por tamanho de partícula

Como método de validação da funcionalização das biomoléculas aos polímeros, foi analisado o raio hidrodinâmico, utilizando o mesmo equipamento e princípios da análise do diâmetro de partículas realizada nas nanopartículas puras, das nanopartículas após a conjugação com o Tocilizumab. Como os anticorpos possuem um tamanho de alguns nanômetros, acima do limite de detecção do equipamento Zeta Sizer NanoZS da Malvern Panalytcs, é de se esperar que o raio hidrodinâmico das partículas seja maior, em comparação com as nanopartículas pré ensaio de adsorção. Então, através da comparação dos tamanhos pré e pós ensaio de adsorção é possível inferir se a conjugação foi ou não bem-sucedida.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Este capítulo trata dos resultados obtidos durante os ensaios realizados neste estudo. Apresenta-se em duas seções distintas. Na primeira, estão dispostos os resultados e discussões relativos à produção das nanopartículas poliméricas. Na segunda, estão dispostos os resultados e discussões relativos à conjugação do tocilizumab as partículas produzidas.

4.1 Preparo e caracterização de nanopartículas

4.1.1 Distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta

Para aplicações farmacêuticas e biomédicas, tamanho e cargas superficiais são fatores fundamentais, modulando diretamente a estabilidade de suspensões, além de outros fatores como a captação celular, toxicidade, tempo de residência, e outros fatores que influenciam diretamente na aplicação bem-sucedida. Neste sentido, para este tipo de aplicação, são desejados tamanhos de partículas menores que 80nm e potenciais zeta com módulos de valores acima de 30, indicando uma maior estabilidade por diminuir a coalescência em meio aquoso (CHEN *et al.*, 2010; ELSABAHY, WOOLEY, 2012; MATTOS, 2021).

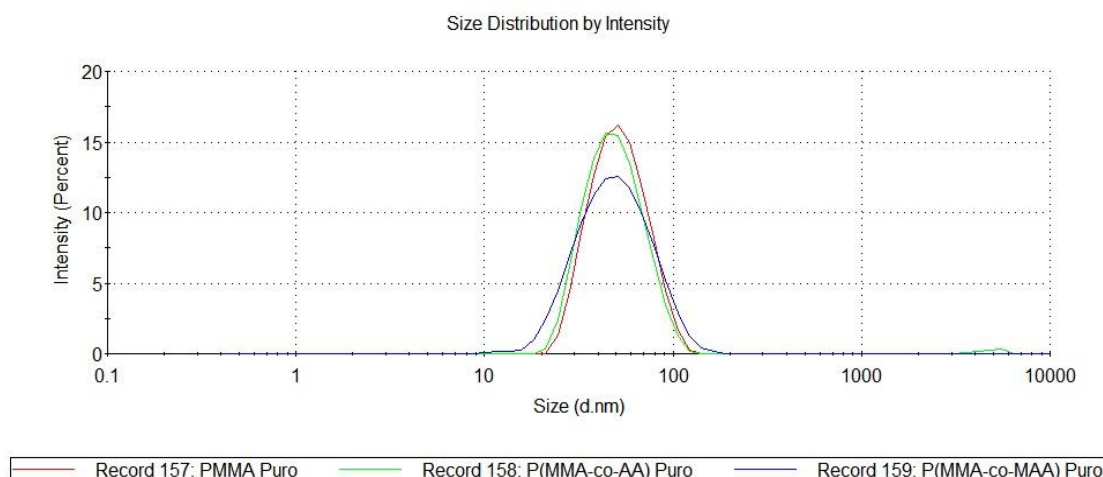


Figura 16 – Resultado do ensaio de DLS, demonstrando a distribuição de tamanho das partículas poliméricas obtidas

O procedimento experimental empregado para a produção dessas nanopartículas é descrito na literatura como um produtor de partículas de tamanho

adequado para este tipo de aplicação, com baixo índice de polidispersão e alta reprodutibilidade. Conforme mostra a Figura 16, neste trabalho, foram produzidas partículas de PMMA com tamanho médio de 48,0nm e Pdl de 0,099, partículas de P(MMA-co-AA) com tamanho médio de 46,0nm e Pdl de 0,148 e partículas de P(MMA-co-MAA) com tamanho médio de 43,6nm e Pdl de 0,158, se mostrando adequados.

Tabela 7 – Tabela comparativa entre as diferentes nanopartículas sintetizadas

	Potencial Zeta (mV)	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersão
PMMA	-55,7	48,0	0,099
P(MMA-co-AA)	-51,2	46,0	0,148
P(MMA-co-MAA)	-52,1	43,6	0,158

Os valores de potencial zeta esperados eram valores negativos com módulos altos, uma vez que, neste procedimento experimental, é utilizada grandes quantidades de Lauril éter sulfato de sódio (SDS), um surfactante anfifílico aniônico, cuja função é estabilizar as micelas durante a polimerização.

4.1.2 Conversão de monômero em polímero

Para calcular a conversão de monômero em polímero, foi utilizada a metodologia de gravimetria com amostragens retiradas nos tempos relativos a cinco, dez, vinte, trinta, sessenta e cento e vinte minutos de reação. O cálculo leva em consideração a massa de polímero presente na amostra e compara com o peso total da fase orgânica presente na reação.

Como o conteúdo reacional foi submetido a um homogeneizador de alta pressão, dentro do qual há água presente para proteção do equipamento, é de se esperar que ocorra, inevitavelmente, a diluição do conteúdo inserido e que alguma parte da mistura reacional seja retida no equipamento. As taxas de conversão obtidas foram de 90,95% para o PMMA, 92,72% para o P(MMA-co-AA), e 97,23% para o P(MMA-co-MAA). Considerando a diluição inerente da técnica utilizada, a ocorrência de dissolução do Ácido Acrílico e do Ácido Metacrílico em água e a precisão experimental, é passível de se realizar a consideração de que houve conversão completa dos monômeros em polímero.

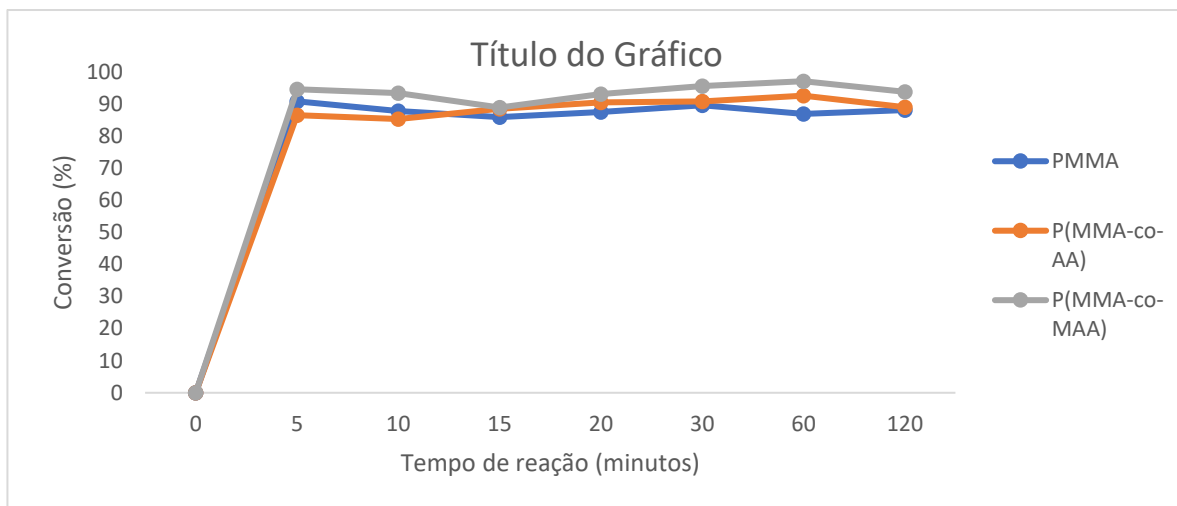


Figura 17 – Conversão dos monômeros em polímero ao longo do tempo da reação

A Figura 17 ilustra a conversão dos monômeros em polímeros em função do tempo de reação. A rápida taxa de conversão é uma característica da técnica de miniemulsão, por apresentar um alto número de partículas em relação a polimerização convencional, e também do iniciador escolhido, o Persulfato de Potássio (KPS), por apresentar altas taxas de degradação à 80°C. Os resultados obtidos são adequados, quando comparados aos resultados obtidos por outros trabalhos de natureza semelhante a este (FONSECA, 2012; LORCA, 2012; MATTOS, 2021; MATTOS *et al.*, 2023).

4.1.3 Distribuição de massa molar dos polímeros

Através do emprego da cromatografia de permeação em gel (GPC), é possível obter os dados relativos a massa molar dos polímeros produzidos e avaliar possíveis mudanças nas propriedades com a adição dos comonômeros.

Em laranja, o homopolímero, PMMA, apresenta uma massa molar média ponderada (M_w) de $1,56 \times 10^6$ Da, enquanto o P(MMA-co-AA), em azul, apresenta M_w de $1,185 \times 10^6$ Da e o P(MMA-co-MAA) possui um M_w de $1,22 \times 10^6$ Da (Figura 18, Tabela 8).

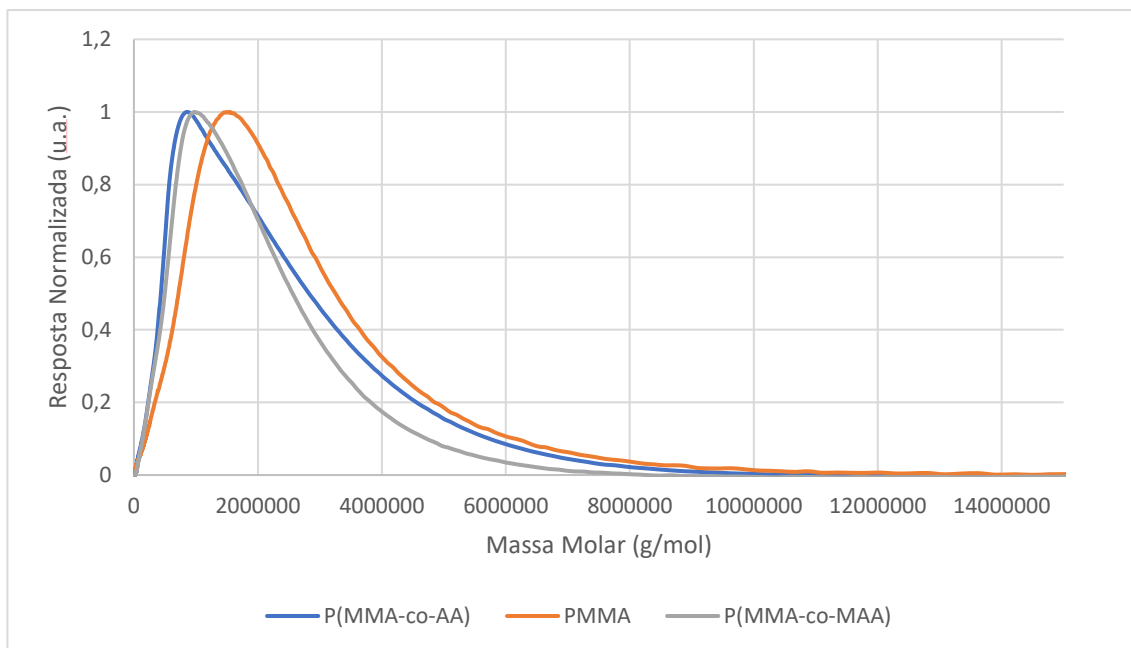


Figura 18 – Distribuição das massas molares obtidas com as polimerizações realizadas no ensaio de Cromatografia por Permeação em Gel

Tabela 8 – Comparação entre massa molar média ponderada (Mw), massa molar média numérica (Mn) e índice de polidispersão (PDI) das massas molares dos polímeros sintetizados

	MW (Da)	MN (Da)	PDI
PMMA	$1,56 \times 10^6$	$5,25 \times 10^5$	2,979
P(MMA-co-AA)	$1,185 \times 10^6$	$5,34 \times 10^5$	2,215
P(MMA-co-MAA)	$1,22 \times 10^6$	$4,88 \times 10^5$	2,499

Uma das características das polimerizações com o Metacrilato de Metila é a presença de um forte efeito gel, gerando polímeros com massa molar elevada. A presença dos comonômeros diminuiu o tamanho médio das massas molares obtidas, sugerindo um leve abrandamento do efeito gel, apesar de ainda serem valores elevados. Como materiais poliméricos são considerados apenas quando massas molares ultrapassam 104 Da, e foram produzidas substâncias com valores de 10^6 Da, é possível considerar que estamos lidando com polímeros de alta massa molar (CANEVAROLO JR, 2010).

Para aplicações farmacêuticas, partículas com massas molares médias elevadas são mais interessantes, por apresentarem uma liberação de ativos por mais tempo, portanto as partículas produzidas têm compatibilidade com a aplicação desejada, com baixo índice de polidispersão, tamanho e reprodutibilidade adequados (KUMARI *et al.*, 2010; MATTOS 2021; MATTOS *et al.*, 2023).

4.1.4 Morfologia das nanopartículas

Através de incidência de um feixe de elétrons, é possível realizar imagens das nanopartículas produzidas e caracterizar sua morfologia. No entanto, ao receber o feixe de elétrons, é possível que haja um acúmulo de carga negativa na amostra, resultando em sua degradação e descargas eletromagnéticas. Esse efeito foi observado em todas as nanopartículas analisadas, sendo mais presente nas partículas com a presença de comonômeros. As amostras preparadas por gotejamento não forneceram imagens nítidas, degradando rapidamente, então somente as amostras liofilizadas serão mostradas.

Na figura 19, é possível observar que o material é formado por nanoesferas, com distribuição de tamanho compatível com a distribuição fornecida pelo ensaio de DLS.

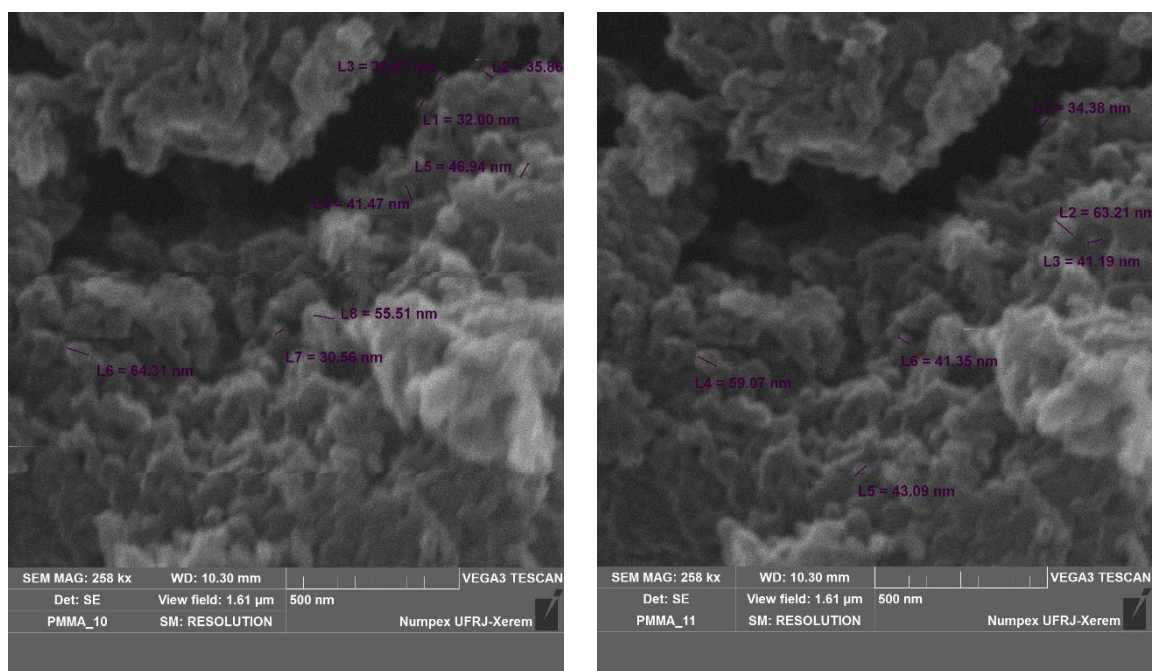


Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas obtidas. A amostra foi preparada através da liofilização do látex resultante, transformando-se em pó, posteriormente fixado em fita dupla face de carbono, para análise no microscópio.

As morfologias indicadas nas imagens estão de acordo o resultado esperado de uma técnica de polimerização em miniemulsão, que produz nanoesferas regulares. Realizar microscopia eletrônica deste tipo de material é um tanto desafiador, por se degradar facilmente com o feixe eletrônico emitido pelo equipamento. Os polímeros com presença de comonômeros se demonstraram mais frágeis que o PMMA puro, só sendo possível a obtenção de imagens deste último. Na literatura, há microscopias disponíveis

que evidenciam de forma mais clara o formato esférico das nanopartículas produzidas (RAMOS, 2018; MATTOS, 2021).

4.1.5 Temperatura de máxima degradação

Análises termogravimétricas (TGA) foram utilizadas para avaliar algumas características térmicas dos polímeros produzidos.

Nestas análises foram observadas que a temperatura de degradação do PMMA foi de 385,2 °C, como mostrado na Figura 20. A presença dos comonômeros alterou levemente a estabilidade térmica dos polímeros, com o P(MMA-co-AA) apresentando 389,4 °C e o P(MMA-co-MAA) apresentando temperatura de máxima degradação de 371,1°C.

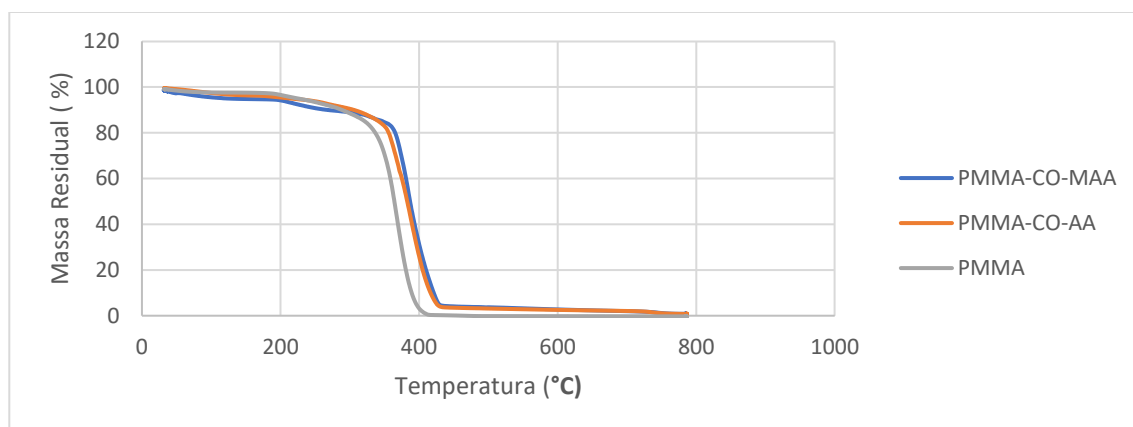


Figura 20 – Ensaio de análise termogravimétrica (TGA)

Possível notar que houve um deslocamento nas curvas para a direita, indicando uma maior estabilidade térmica com a adição dos comonômeros ao meio reacional, efeito já descrito na literatura (RAMOS, 2018; MATTOS, 2021).

4.1.6 Temperatura de Transição Vítreia (Tg)

Para determinar a taxa de incorporação dos comonômeros nos polímeros produzidos, foi empregada a análise por calorimetria diferencial exploratória (DSC). A Tg do Poli Ácido Acrílico, na literatura, varia entre 75 e 106°C, enquanto que do Poli Ácido Metacrílico está na casa dos 228°C. Essas temperaturas são abaixo e acima da Tg do PMMA puro, descrito na literatura na casa dos 117°C. Como os comonômeros representam apenas 10% da massa total de monômeros, é esperado um leve

deslocamento na Tg, caso a incorporação destes nas partículas tenha sido bem-sucedida (CAMPOS *et al.*, 2016; PEIXOTO, 2016; ULU *et al.*, 2016; MATTOS, 2021).

Os dados obtidos das análises foram temperaturas de transição vítrea de 121,00°C, 115,21°C e 136,7°C para o PMMA, P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA), respectivamente. Esses dados, novamente, indicam uma incorporação bem-sucedida dos comonômeros nas estruturas das cadeias poliméricas de metacrilato de metila (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação entre as temperaturas de transição vítrea dos polímeros obtidos e os polímeros descritos na literatura.

	Este trabalho (°C)	Literatura (°C)
PMMA	121,00	117
PAA	Não sintetizado	75-106
PMAA	Não sintetizado	228
P(MMA-co-AA)	115,21	107
P(MMA-co-MAA)	136,7	134

4.2 Conjugações de anticorpos

Nesta seção, se apresenta a análise dos dados a respeito das estratégias escolhidas para as conjugações. A partir de dados da literatura, é possível esperar altas taxas de conjugação, principalmente pelo fato de as concentrações de proteínas utilizadas serem menores do que utilizadas em outros estudos. Para inferir o sucesso da conjugação, foram realizadas análises de eficiência de adsorção, ensaio de dessorção, além da diferença no tamanho de partícula entre os polímeros sem e com a conjugação e correlação entre os espectros de infravermelho (FTIR) (THIRAMANAS *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2014; MATTOS, 2021).

4.2.1 Adsorção física

4.2.1.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização

Ao realizar o ensaio de adsorção entre anticorpo e nanopartícula, é esperado que ocorra um aumento do diâmetro médio, conforme as camadas de adsorção se formem. Para averiguar o comportamento do diâmetro de acordo com as funcionalizações, foi realizada a análise dos diâmetros hidrodinâmicos, através da técnica de DLS.

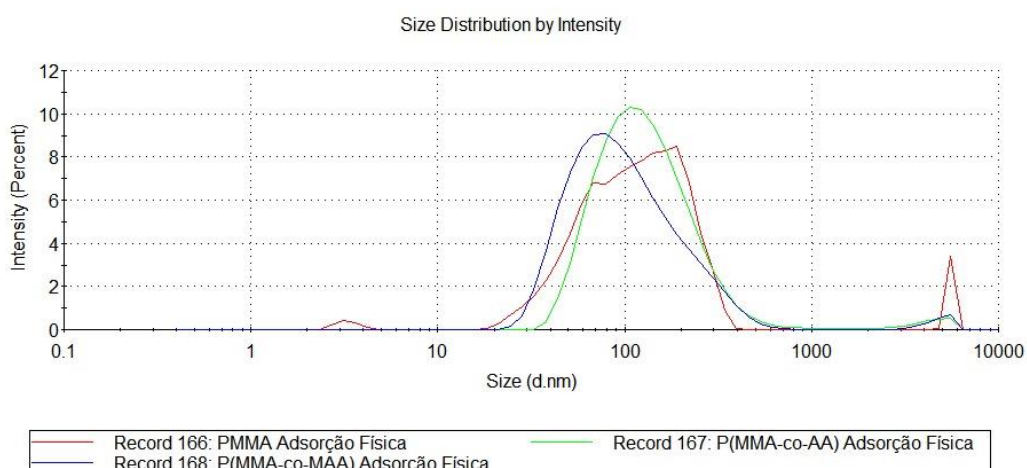


Figura 21 – Ensaio de DLS realizado após os ensaios de adsorção física, ilustrando a nova distribuição de tamanho de partículas

Na Figura 21, é possível observar o aumento significativo no tamanho médio das nanopartículas, de 48, 46 e 43,6 nanômetros para 117, 102 e 133,9 nanômetros para o PMMA, P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA), respectivamente, além de um aumento na abrangência da distribuição de tamanhos (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação entre os tamanhos originais das nanopartículas e os tamanhos após a adsorção física

	Original (nm)	Pós Conjugação (nm)
PMMA	48	117
P(MMA-co-AA)	46	102
P(MMA-co-MAA)	43,6	133,9

Como os anticorpos monoclonais utilizados neste ensaio possuem apenas 148kDa, a mudança relacionada apenas à formação de uma monocamada das biomoléculas, a alteração esperada seria mais sutil. Nesse caso, especula-se a presença de dois fenômenos simultâneos. Primeiramente, deve-se levar em conta que com a filtração, houve a retirada de surfactantes, reduzindo a estabilidade da suspensão das nanopartículas e, portanto, facilitando a aglomeração das nanopartículas, que devem constituir os picos presentes acima de 1000 nanômetros. Além disso, é possível que as cadeias laterais dos aminoácidos presentes nas estruturas do anticorpo estejam interagindo através de forças intermoleculares atrativas, juntando duas ou mais nanopartículas para formar o pico principal, entre 50 e 200 nanômetros. Por fim, o pico presente entre 1 e 10 nanômetros é compatível com o tamanho esperado de uma molécula de anticorpo de 148000 Daltons, que não foram adsorvidas ou desorveram durante o ensaio.

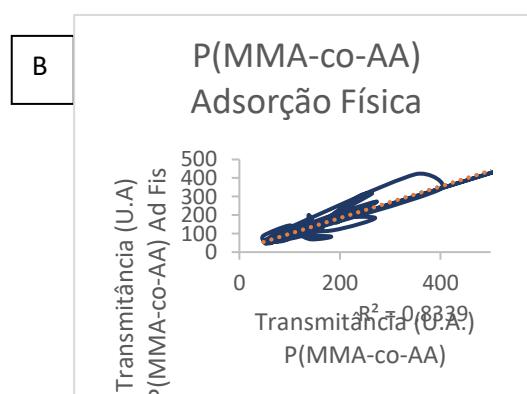
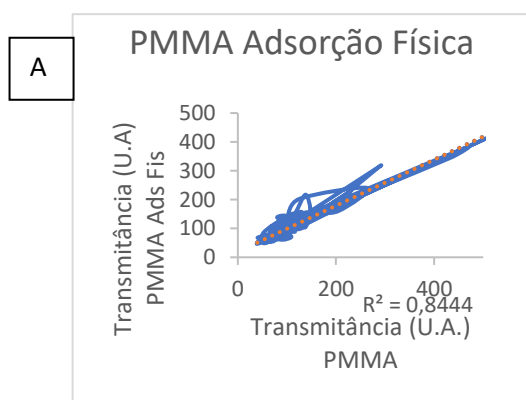
4.2.1.2 Análise de espectro infravermelho

Através de aplicação de feixes de luz de comprimento específicos, é possível causar excitação em ligações moleculares específicas presentes nas estruturas químicas das moléculas analisadas.

No referente ao PMMA e seus copolímeros, suas bandas estão localizadas principalmente em torno de 1730 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} , referente vibração dos grupos carboxila do ácido carboxílico, carbonila do éster, e ligação C-O do éster, respectivamente (ULU *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016).

No que tange a conjugações químicas, é possível encontrar, na literatura, o aparecimento de uma ligação na região de 1600 cm^{-1} , referente ao surgimento de uma ligação amida. No entanto, essa banda não foi identificada nos espectros obtidos pelo equipamento IR-Tracer 100, da Shimadzu, o que também é possibilidade encontrada literatura científica disponível, devido ao tamanho elevado do anticorpo monoclonal selecionado para o estudo. No caso de adsorções físicas, as interações são fracas demais para serem identificadas no equipamento com o tamanho elevado do polímero e anticorpo, interações entre cadeias poliméricas, entre outros fatores. Com isto em mente, foi decidido não apresentar os espectros, que estão presentes no apêndice, em prol de uma melhor apresentação dos resultados obtidos (RAMOS, 2018; MATTOS, 2021).

Apesar da dificuldade encontrada em identificar a formação de amida, comprovando a conjugação, é possível apresentar a comparação do espectro de transmitância do polímero puro com o conjugado e analisar o coeficiente de correlação (R^2) entre os espectros. Caso a conjugação tenha sido má-sucedida, é esperado um R^2 próximo de 1.



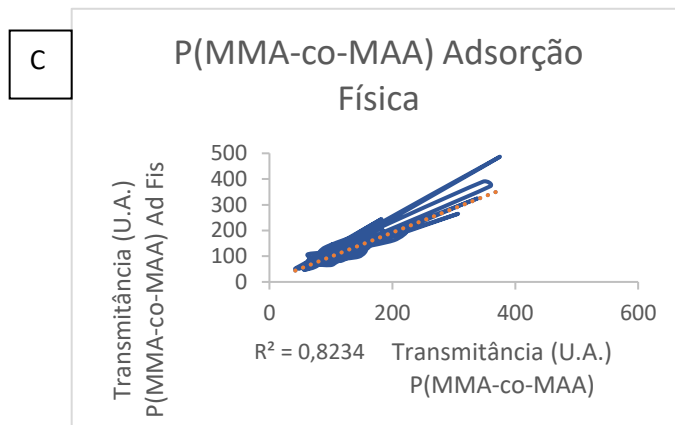


Figura 22 – Gráfico de correlação entre os espectros infravermelhos dos polímeros puros e polímeros após a adsorção física. A) Polimetacrilato de metila, B) Poli(metacrilato de metila co ácido acrílico), C) Poli(metacrilato de metila co ácido metacrílico)

Na figura 22, é possível observar que o coeficiente de correlação é baixo, em torno de 0,8, permitindo inferir que a conjugação foi bem-sucedida

4.2.1.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção

Outro método empregado para a avaliação da eficiência de cada estratégia de conjugação foi a quantificação de proteínas presentes no filtrado. Como os poros das membranas são de 500kDa, apresentam diâmetros grandes o suficiente para permitir a passagem dos anticorpos monoclonais não conjugados, enquanto retém as nanopartículas.

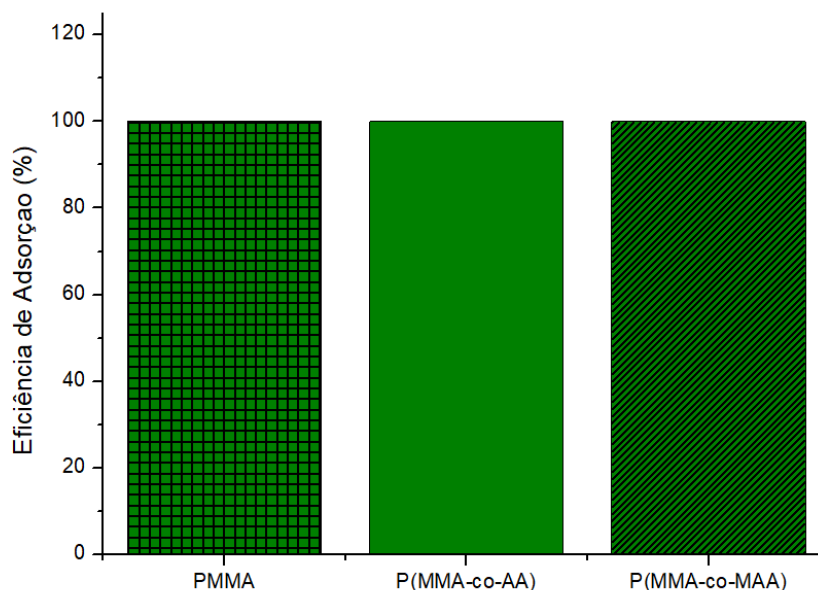


Figura 23 – Gráfico da eficiência de adsorção do ensaio de adsorção física

Na figura 23, é possível observar que durante o ensaio de adsorção física, não houve qualquer detecção do Tocilizumab no filtrado. No entanto, como as interações que governam a adsorção física são de longo alcance, porém baixa intensidade, é esperado que haja uma dessorção significativa após algumas lavagens.

Realizou-se três lavagens subsequentes das amostras do polímero P(MMA-co-MAA), filtrado com uma membrana de 300kDa. O filtrado foi recolhido e analisado utilizando a mesma metodologia. Após essas lavagens, foi dessorvido 26,48% do anticorpo adsorvido (Tabela 11).

Tabela 11 – Quantidade de anticorpos dessorvidos por lavagem e a porcentagem de anticorpos dessorvidos ao final das três lavagens

	Lavagem 1 (μg)	Lavagem 2 (μg)	Lavagem 3 (μg)	Total (μg)	Porcentagem Dessorvida
P(MMA-co-AA)	12,75 \pm 1,76	3,15 \pm 3,75	0,65 \pm 0,35	16,55 \pm 1,6	26,48% \pm 2,6

4.2.2 Adsorção química com Sulfo-NHS e EDC

4.2.2.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização

A Figura 24 permite observar a distribuição de tamanhos após o ensaio de adsorção química utilizando apenas o Sulfo-NHS e o EDC como agentes. Percebe-se um aumento nos tamanhos médios das nanopartículas, de 48, 46 e

43,6 nanômetros para 117, 102 e 133,9 nanômetros para o PMMA, P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA), respectivamente. Novamente, nota-se a presença de um pico relacionado à aglomeração de nanopartículas, bem acima dos 1000 nanômetros. Outro pico esperado da conjugação entre dois ou mais anticorpos monoclonais está presente na casa de 10 nanômetros, apesar de presente apenas na amostra do P(MMA-co-MAA).

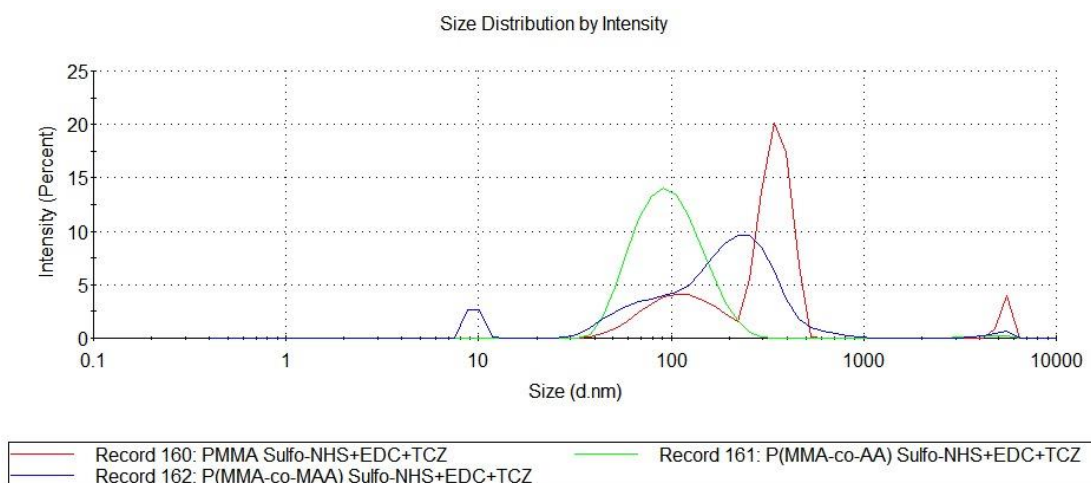


Figura 24 – Ensaio de DLS realizado após conjugação utilizando Sulfo-NHS e EDC, com distribuição de partículas após o ensaio

Quanto à distribuição principal de tamanho das nanopartículas, não é o resultado esperado de apenas a conjugação entre nanopartícula e anticorpos monoclonais. Observa-se que novamente, que as haja interação entre as moléculas de Tocilizumabe adsorvidas, favorecendo a junção de duas ou mais nanopartículas, contribuindo para a formação de picos de distribuição mais larga, como observado (Tabela 12).

Tabela 12 – Comparação dos tamanhos médios das nanopartículas antes e após o ensaio de adsorção química utilizando Sulfo-NHS e EDC

	Original (nm)	Após Conjugação (nm)
PMMA	48,0	117
P(MMA-co-AA)	46,0	102
P(MMA-co-MAA)	43,6	133,9

4.2.2.2 Análise de espectro infravermelho

Seguindo a mesma lógica do espectro infra-vermelho apresentado na seção 4.2.1.2, a correlação entre os espectros foi baixa, em torno de 0,84, como ilustrado na Figura 25.

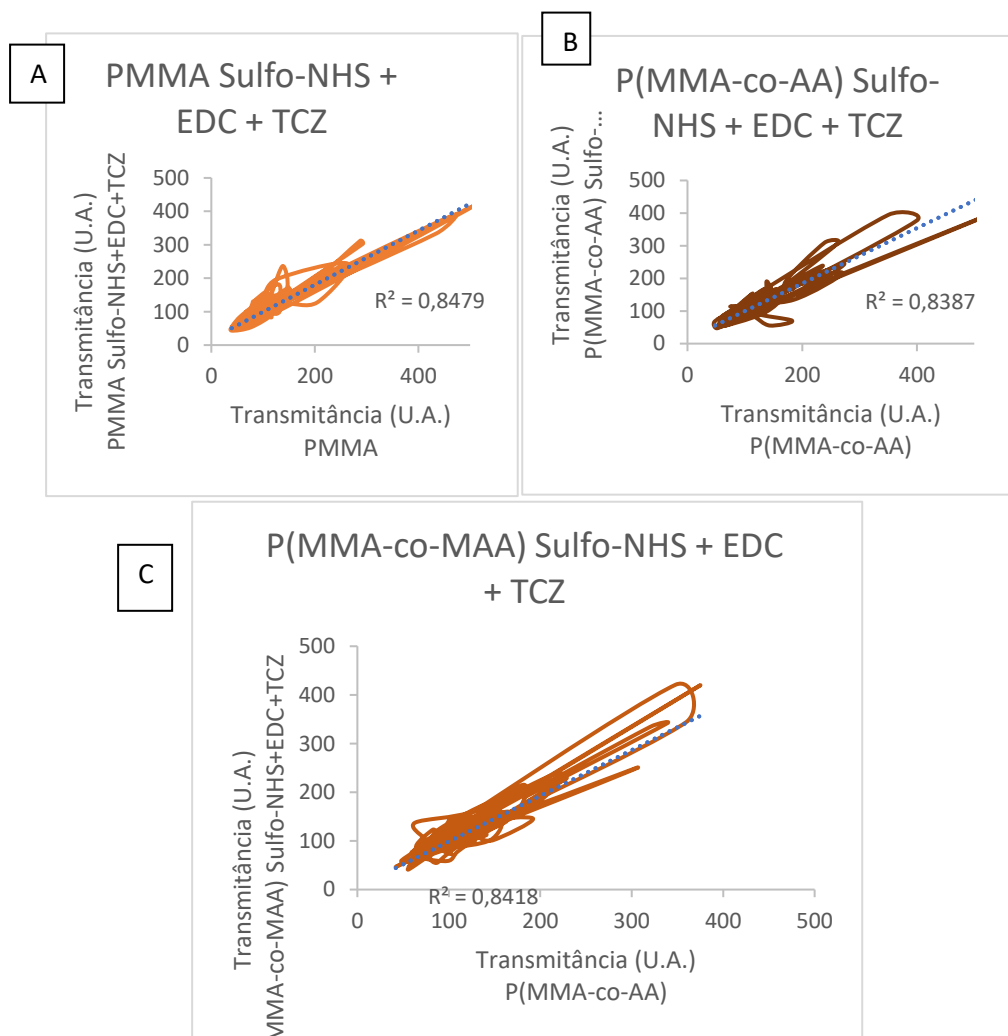


Figura 25 – Correlação entre os espectros do polímero puro com o polímero após ensaio de adsorção química utilizando Sulfo-NHS e EDC. A) Polimetacrilato de metila, B) Poli(metacrilato de metila co ácido acrílico), C) Poli(metacrilato de metila co ácido metacrílico).

Junto aos resultados anteriores, pode-se inferir uma adsorção química bem-sucedida entre o Tocilizumabe e as nanopartículas poliméricas.

4.2.2.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção

Contrário ao indicado na literatura, a rota de adsorção química mediada por Sulfo-NHS e EDC acabou se mostrando pouco eficiente em promover uma ligação entre os polímeros e o Tocilizumabe, como ilustrado na Figura 26. Não obstante, a dessorção observada foi quase que completa. Houve dessorção referente à 96,48% da quantidade de anticorpos introduzidas durante o ensaio, ao longo das três lavagens (Tabela 13).

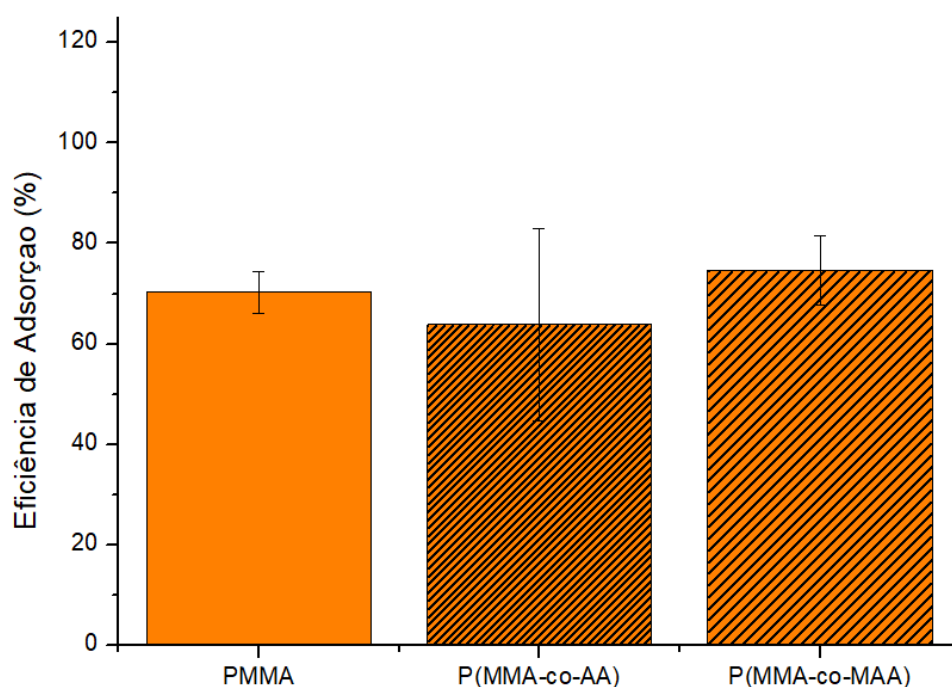


Figura 26 – Gráfico de eficiência de adsorção do ensaio de adsorção química utilizando Sulfo-NHS e EDC

O pico presente na casa dos 10 nanômetros indica uma possível conjugação entre anticorpos, desfavorecendo a ligação entre a cadeia lateral dos aminoácidos disponíveis e os grupos carboxílicos presentes nas nanopartículas. Ademais, os tamanhos quase que idênticos aos obtidos nos ensaios de adsorção física, indicam que o que está ocorrendo é, na verdade, apenas a adsorção física das biomoléculas conjugadas entre si. A diferença na eficiência de adsorção, comparada à adsorção física pura, pode ser explicada pela alteração conformacional dos anticorpos ao se ligarem uns aos outros, atrapalhando na interação eletroestática entre nanopartícula e aglomerados de anticorpos. Na literatura, Mattos mostrou sucesso ao utilizar um protocolo de pré-ativação dos polímeros com o Sulfo-NHS e EDC e só então adicionar as biomoléculas, o que pode inibir a conjugação anticorpo-anticorpo e desfavorecer a

ocorrência de adsorção física nesta estratégia (CHEN *et al.*, 2020; MATTOS, 2021; MATTOS *et al.*, 2023).

Tabela 13 – Quantidade de anticorpos dessorvidos após cada lavagem e porcentagem total de anticorpos dessorvidos ao final das três lavagens

	Lavagem 1 (μg)	Lavagem 2 (μg)	Lavagem 3 (μg)	Total (μg)	Porcentagem dessorvida
P(MMA-co- MAA)	17,5 \pm 4,46	13,75 \pm 3,65	14,90 \pm 5,00	45,83 \pm 3,1	96,48 \pm 6,5

No entanto, é observável na análise de DLS, apresentada na seção anterior, que há a presença de um pico em torno de 10 nanômetros, que é o tamanho esperado de um dímero ou trímero de Tocilizumabes, exclusivamente na amostra de P(MMA-co-MAA). Portanto, é possível que os outros polímeros tenham sido capazes de promover uma retenção maior dos anticorpos monoclonais em sua superfície após as lavagens. Outro ponto a ser observado é que as concentrações de Sulfo-NHS e EDC utilizadas neste tipo de ensaio difere enormemente a depender da literatura, sendo a quantidade escolhida para este trabalho presente na parte inferior do espectro disponível na literatura. Talvez, a utilização de concentrações maiores permita obter-se resultados diferentes (THIRAMANAS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2020).

4.2.3 Adsorção química com Ácido Indol 3-Butírico e UV

4.2.3.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização

A distribuição de tamanhos das nanopartículas foi observada, após a realização das duas etapas de funcionalização (Figura 27).

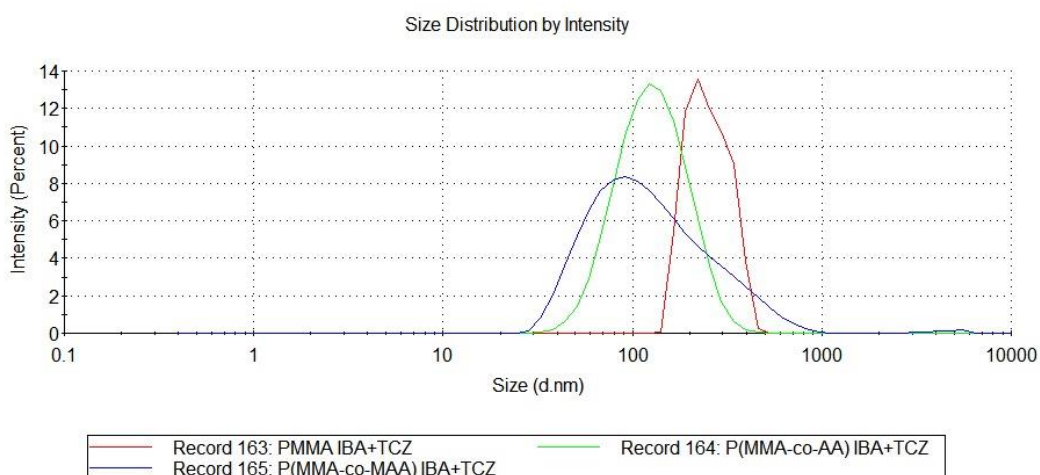


Figura 27 – Nova distribuição de tamanhos de partícula, através do ensaio de DLS realizado após as conjugações com Ácido Indol 3-Butírico e Luz Ultravioleta

Os tamanhos médios saltaram de 48, 46 e 46,3 nanômetros para 256,1, 117,2 e 110,4, para o PMMA, P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA), respectivamente (Tabela 14). Desta vez, o pico referente a anticorpos monoclonais desorvidos ou ligados entre si não foi detectado, provavelmente devido à especificidade relacionada à ligação do NBS com o Ácido Indol 3-Butírico.

Tabela 14 – Tabela comparando tamanhos das nanopartículas antes e depois da conjugação utilizando Ácido Indol 3-Butírico e luz ultravioleta

	Original (nm)	Após conjugação (nm)
PMMA	48,0	256,1
P(MMA-co-AA)	46,0	117,2
P(MMA-co-MAA)	43,6	110,4

No entanto, o deslocamento do tamanho médio ainda é grande demais para ser relacionado apenas a adsorção química, com alta probabilidade de ter parte de seu aumento relacionado com a interação entre nanopartículas funcionalizadas.

4.2.3.2 Análise de espectro infravermelho

Quanto à análise do espectro infravermelho, foram realizadas análises após a primeira etapa e após a segunda etapa de funcionalização. A racionalidade por trás dessa análise extra é que deve haver uma correlação maior entre o polímero após a primeira conjugação com a segunda conjugação do que com o polímero puro.

Esse comportamento esperado foi confirmado, e, juntamente com as outras análises é possível afirmar que este tipo de estratégia conjugação também foi efetiva em realizar a ligação entre anticorpo monoclonal e nanopartículas poliméricas (Figura 28).

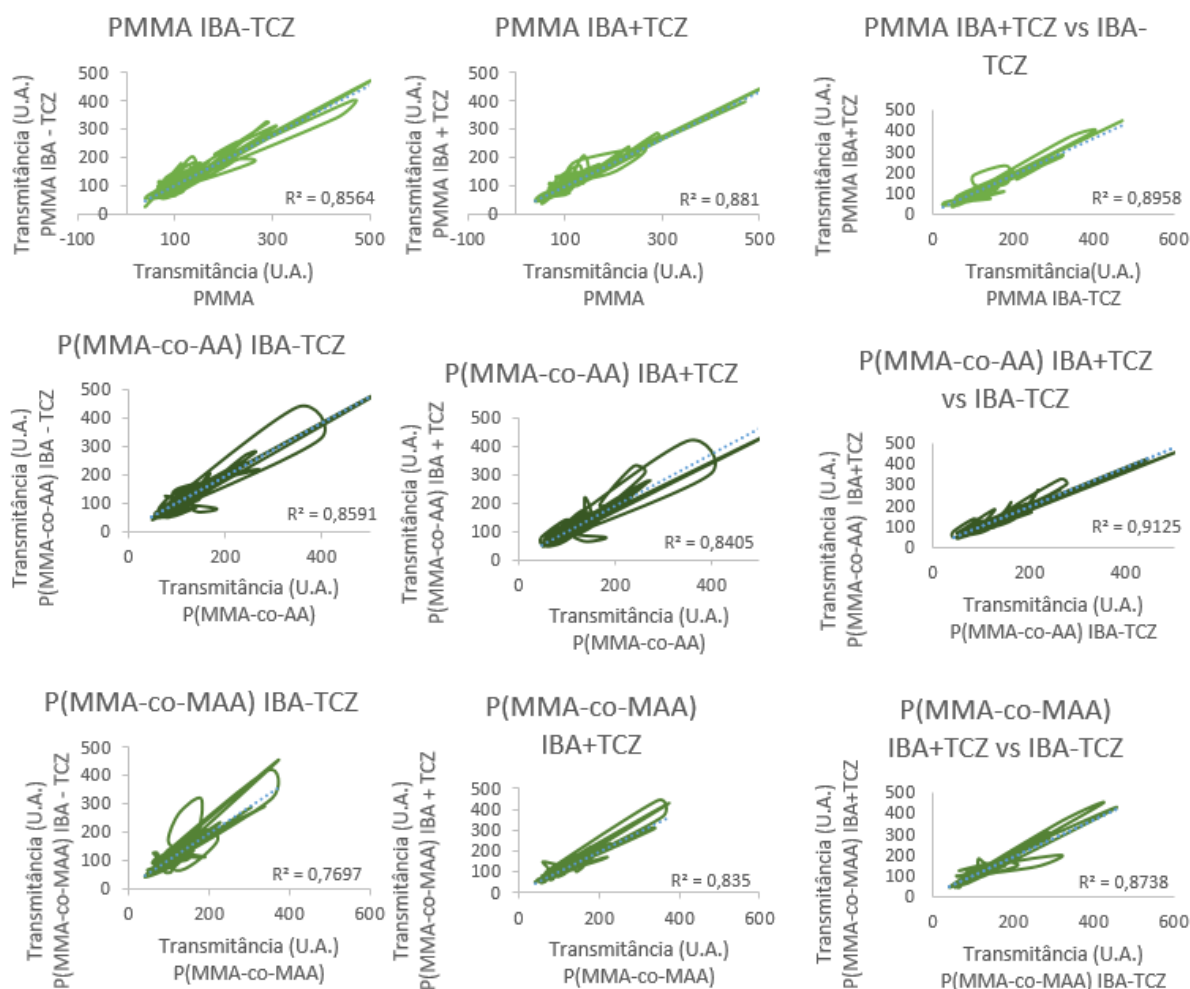


Figura 28 – Correlação entre os espectros do polímero puro x conjugado com IBA, polímero puro x conjugado com IBA e TCZ, e polímero conjugado com IBA e TCZ x conjugado apenas com IBA. Legenda: A) PMMA com IBA x PMMA puro, B) PMMA com IBA e TCZ x PMMA puro, C) PMMA com IBA e TCZ x PMMA com IBA, D) P(MMA-co-AA) com IBA x P(MMA-co-AA) puro, E) P(MMA-co-AA) com IBA e TCZ x P(MMA-co-AA) puro, F) P(MMA-co-AA) com IBA e TCZ x P(MMA-co-AA) apenas com IBA, G) P(MMA-co-MAA) conjugado com IBA x P(MMA-co-MAA) puro, H) P(MMA-co-MAA) conjugado com IBA e TCZ x P(MMA-co-MAA) puro, I) P(MMA-co-MAA) conjugado com IBA e TCZ x P(MMA-co-MAA) conjugado apenas com IBA.

4.2.3.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção

A estratégia de conjugação entre anticorpo e polímero através do uso do ácido Indol 3-Butírico vêm sendo investigada há alguns anos na literatura com resultados promissores, devido a estabilidade e especificidade da ligação sem comprometer a atividade dos anticorpos. Desta forma, o resultado esperado são altas taxas de

conjugação e baixas quantidades de anticorpo desorvido após as lavagens (ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013a, 2013b; ALVES *et al.*, 2014; ALVES, 2019).

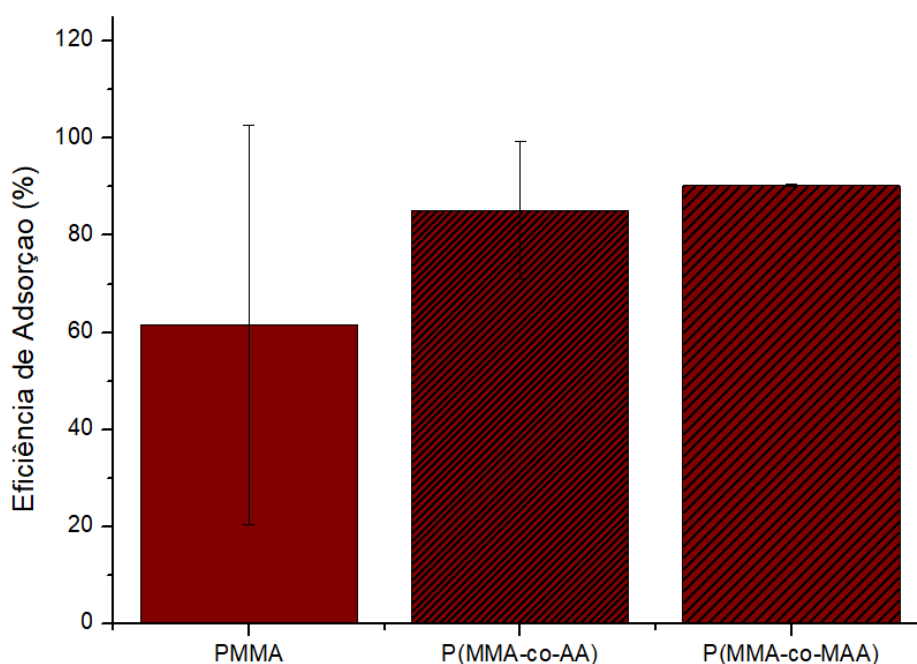


Figura 29 – Eficiência de adsorção do ensaio realizado com Ácido Indol 3-Butírico e Luz Ultravioleta

No entanto, é possível observar grande variação nos resultados dos ensaios realizados com o PMMA e o P(MMA-co-AA). Como a conjugação é realizada sob incidência de luz ultravioleta, é plausível supor que algumas variáveis não controladas tenham interferido no resultado obtido, como grau de incidência de luz externa, espectro da luz externa incidente e temperatura. Ressalta-se também que o experimento foi realizado em uma câmara escura adaptada, sendo protegido da luz externa através de um composto têxtil. Desta forma, sugere-se que futuros estudos sejam conduzidos controlando estas variáveis mencionadas, além da utilização de uma proteção da luz externa de melhor qualidade (Figura 29).

De todo modo, após a lavagem, observou-se boa retenção dos anticorpos utilizados no ensaio (Tabela 15). Devido às características apresentadas na literatura sobre este tipo de estratégia, é plausível supor que houve uma saturação dos sítios de ácido indol 3-butírico nas superfícies das nanopartículas e houve a ocorrência de adsorção física concomitantemente a adsorção química, sendo os anticorpos desorvidos referentes apenas referentes a adsorção física. Para futuros trabalhos, sugere-se a busca da otimização nas quantidades de ácido indol 3-butírico e anticorpo

empregados neste tipo de ensaio (ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013a, 2013b; ALVES *et al.*, 2014; ALVES, 2019).

Tabela 15 – Quantidade de anticorpos desorvida a cada lavagem e a porcentagem total de anticorpos desorvidos após as três lavagens

	Lavagem 1 (μg)	Lavagem 2 (μg)	Lavagem 3 (μg)	Total (μg)	Porcentagem desorvida
P(MMA-co-MAA)	3,64 \pm 5,14	8,33 \pm 2,77	6,23 \pm 1,47	18,2 \pm 6,43	32 \pm 11,3

4.2.4 Adsorção química com Estreptavidina e Biotina

4.2.4.1 Distribuição de tamanho de partícula após a funcionalização

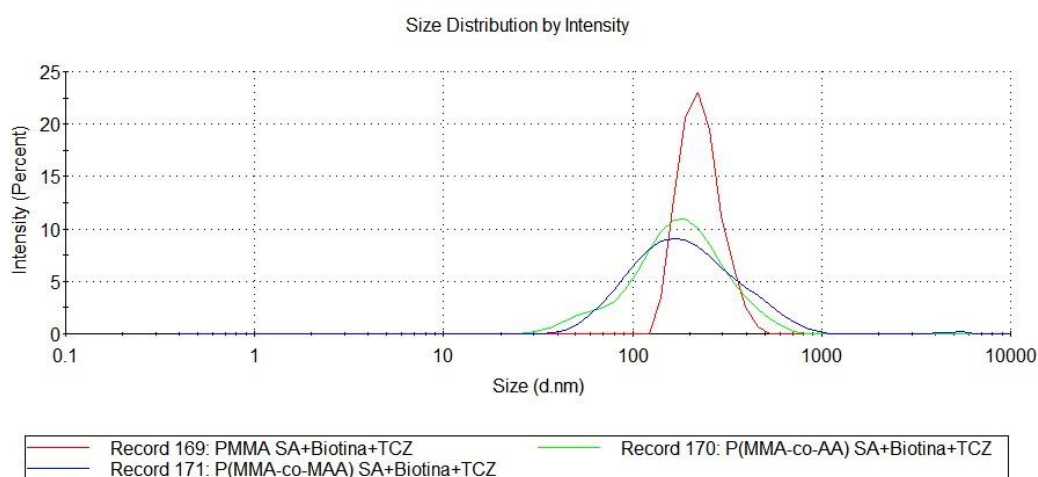


Figura 30 – Análise de DLS, ilustrando a nova distribuição de tamanhos após o ensaio de conjugação, utilizando estreptavidina e biotina.

Por fim, a Figura 30 mostra a distribuição de tamanhos, após as duas etapas de conjugação utilizando a biotina e estreptavidina. É possível observar novamente um aumento do tamanho médio das nanopartículas, de 48, 46 e 43,6 nanômetros para 233,0 199,3 e 224,2 nanômetros do PMMA, P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA), respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16 – Tabela comparando os tamanhos das nanopartículas antes e após o ensaio de adsorção química utilizando estreptavidina e biotina

	Original (nm)	Após Conjugação (nm)
PMMA	48,0	233,0
P(MMA-co-AA)	46,0	199,3
P(MMA-co-MAA)	43,6	224,2

Assim como na funcionalização anterior, não há a presença de picos referentes a anticorpos monoclonais não conjugados às nanopartículas poliméricas. No entanto, o aumento expressivo no tamanho médio é um forte indicativo de que há aglomerações ocorrendo, pelo menos em algum nível, das nanopartículas, provavelmente proveniente das forças de interação entre as cadeias laterais dos aminoácidos presentes na estrutura molecular do Tocilizumabe. Ressalta-se a ausência de agentes surfactantes na solução em que os polímeros foram ressuspensos, o que facilita este tipo de aglutinação molecular.

4.2.4.2 Análise de espectro infravermelho

A Figura 31 ilustra as correlações entre os espectros infravermelho obtidos através da técnica de FTIR. A lógica segue a mesma da análise anterior, na qual foi feita a análise após cada etapa de conjugação e o aumento de correlação entre os espectros após a primeira e segunda etapas se manteve. Esses resultados indicam uma conjugação bem-sucedida entre estreptavidina e nanopartícula e entre a estreptavidina presente nas nanopartículas e o anticorpo biotinizado.

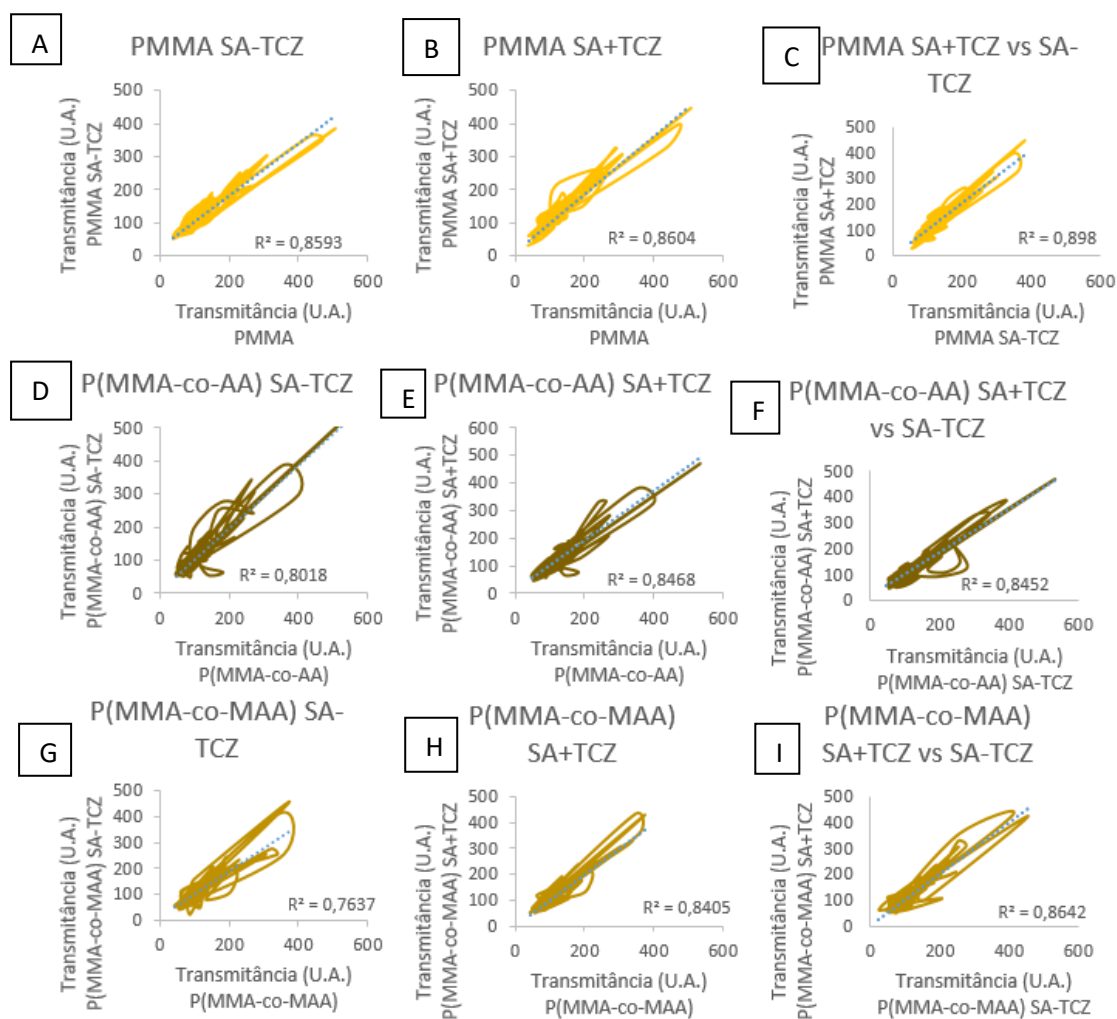


Figura 31 – Correlação entre os espectros infravermelhos antes e após ensaios de conjugação. Legenda: A) PMMA conjugado com Estreptavidina x PMMA puro, B) PMMA conjugado com SA e TCZ x PMMA Puro, C) PMMA com SA e TCZ x PMMA com SA, D) P(MMA-co-AA) com SA x P(MMA-co-AA) puro, E) P(MMA-co-AA) com SA e TCZ x P(MMA-co-AA) puro, F) P(MMA-co-AA) com SA e TCZ x P(MMA-co-AA) com SA, G) P(MMA-co-MAA) com SA x P(MMA-co-MAA) puro, H) P(MMA-co-MAA) com SA e TCZ x P(MMA-co-MAA) puro, I) P(MMA-co-MAA) com SA e TCZ x P(MMA-co-MAA) com SA.

4.2.4.3 Eficiência de adsorção e ensaio de dessorção

A estratégia de conjugação utilizando a biotilação de um anticorpo monoclonal com a estreptavidina é bem descrita na literatura e bastante utilizada na produção de biossensores, incluindo de base polimérica. Confirmou-se os otimistas resultados esperados dessa estratégia, como mostra a Figura 32.

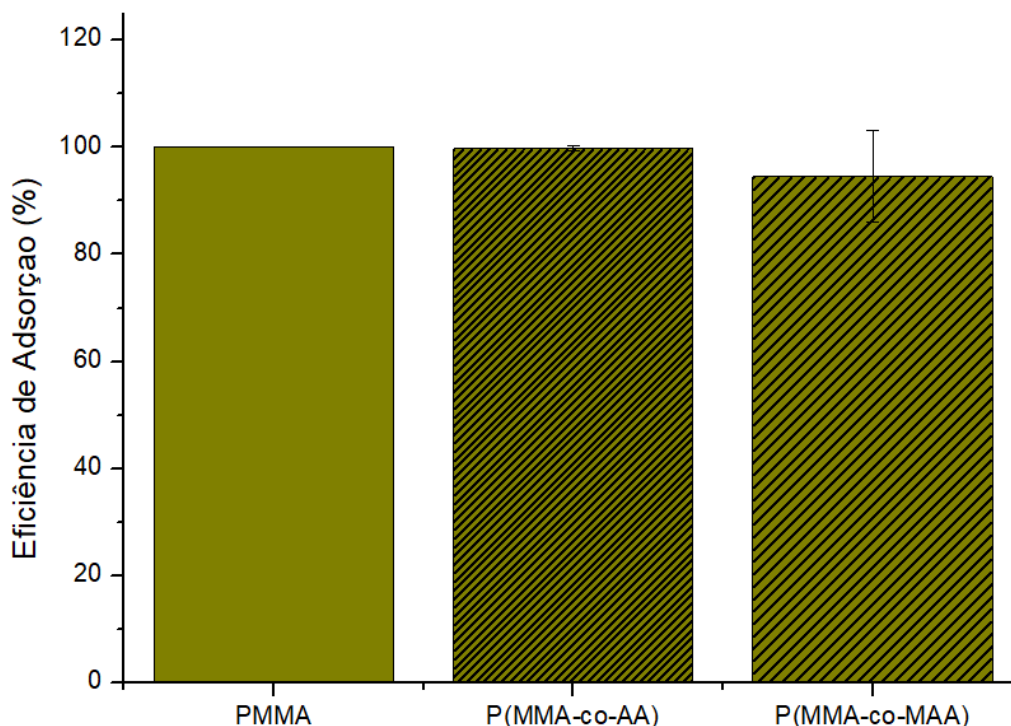


Figura 32 – Eficiência de adsorção dos ensaios utilizando estreptavidina e biotina

Altas taxas de conjugação foram atingidas, com alta reprodutibilidade do resultado, como indicado pelas barras de erros diminutas. Ademais, foram observadas altas taxa de retenção dos anticorpos após as lavagens, com 96,72% de todo o Tocilizumabe utilizado nos ensaios de P(MMA-co-MAA) permanecendo conjugado (Tabela 17).

Tabela 17 – Quantidade de anticorpos dessorvidos após cada lavagem e a porcentagem total dessorvida ao final das três lavagens

	Lavagem 1 (μg)	Lavagem 2 (μg)	Lavagem 3 (μg)	Total (μg)	Porcentagem dessorvida
P(MMA-co-MAA)	$1,52 \pm 0,67$	$1,61 \pm 0,26$	$1,19 \pm 0,46$	$4,32 \pm 0,06$	$7,28 \pm 0,11$

4.3 Considerações finais

As nanopartículas poliméricas foram produzidas com sucesso, com tamanho e formato adequados para a aplicação sugerida, com alto índice de conversão. A adição dos comonômeros elicitou uma incorporação bem-sucedida na estrutura polimérica, promovendo as alterações na estabilidade térmica esperadas. No entanto, mesmo com a presença do ácido acrílico e do ácido metacrílico nas estruturas moleculares das cadeias poliméricas, não é possível afirmar com toda certeza que não houve diferença

entre os três compostos, devido à variabilidade encontrada dentro das replicatas, podemos ver uma comparação na Tabela 18.

Tabela 18 – Comparação dos tamanhos antes e após as diferentes estratégias de conjugação e as porcentagens de adsorção e dessorção de cada método escolhido

	Tamanho Antes (nm)	Tamanho Depois (nm)	Eficiência de Adsorção (%)	Porcentagem de dessorção (%)
PMMA Ad. Fís.	48,0	117,0	100±0	-
PMMA Sulfo-NHS + EDC	48,0	117,0	70,24±4,11	-
PMMA IBA + UV	48,0	256,1	61,52±41,06	-
PMMA SA + Biotina	48,0	233,0	100±0	-
P(MMA-co-AA) Ad. Fís.	46,0	102,0	100±0	-
P(MMA-co-AA) Sulfo-NHS + EDC	46,0	102,0	63,84±19,13	-
P(MMA-co-AA) IBA + UV	46,0	117,2	85,17±14,07	-
P(MMA-co-AA) SA + Biotina	46,0	199,3	99,73±0,46	-
P(MMA-co-MAA) Ad. Fís.	43,6	133,9	100±0	26,5±2,6
P(MMA-co-MAA) Sulfo-NHS + EDC	43,6	133,9	74,67±6,84	96,5±6,5
P(MMA-co-MAA) IBA + UV	43,6	110,4	90,24±0,22	32,0±11,3
P(MMA-co-MAA) AS + Biotina	43,6	224,2	94,56±8,6	7,3±0,1

Ao que todos os dados apontam, todas as estratégias foram capazes de promover a adsorção, seja física ou química, dos anticorpos monoclonais as nanopartículas poliméricas produzidas. Contrariamente aos resultados esperados, a que apresentou as maiores taxas de adsorção foi a estratégia de adsorção física, seguida pela adsorção química utilizando Estreptavidina e Biotina e, em terceiro lugar a utilização do ácido indol 3-butírico.

No entanto, apesar dos números, a adsorção física pode não ser tão vantajosa assim. Como discutido nos capítulos anteriores, a falta de controle da posição do anticorpo monoclonal é um possível impeditivo na utilização desta estratégia na construção de anticorpos conjugados a outras estruturas para emprego na medicina humana, por possivelmente apresentar alta variabilidade entre lotes produzidos. Ademais, o emprego da Estreptavidina e Biotina apresentaram eficiências de adsorção próximas, porém foram bem mais eficientes na retenção dos anticorpos monoclonais. Adicionalmente, ressalta-se a especificidade da localização da ligação, que é característica a esta técnica.

Em terceiro lugar em eficiência de adsorção, está a ligação mediada por irradiação de luz no espectro do ultravioleta e ácido indol 3-butírico. É uma técnica que vem sendo explorada na literatura há alguns anos, porém ainda há uma escassez de dados a respeito. Durante este trabalho, se mostrou sendo uma técnica promissora pela capacidade de ligação sítio específica e retenção dos anticorpos monoclonais. É passível de acreditar que haja amplo espaço para a otimização dessa técnica através da manipulação das concentrações de ácido indol 3-butírico, sulfo-NHS e EDC utilizados na primeira etapa de conjugação, além da melhoria do controle de variáveis externas como a incidência de luz de outros espectros durante o experimento.

Em último lugar, a ligação mediada somente com Sulfo-NHS e EDC. Com baixos índices de adsorção e com altas taxas de dessorção após as lavagens. Ao que tudo indica, também a presença de ligação de anticorpos com outros anticorpos nas amostras do P(MMA-co-MAA). É possível que pequenas modificações no protocolo elicitam uma mudança considerável na eficiência desta estratégia, como o aumento das concentrações utilizadas, mas também na separação em duas etapas, realizando primeiramente uma etapa de ativação do polímero com o Sulfo-NHS e EDC, e, posteriormente, uma etapa de incubação com o anticorpo monoclonal, como realizado por MATTOS em 2021.

CAPÍTULO 5

Conclusões

5.1 Conclusão

O objetivo principal, que é realizar o início do desenvolvimento de um ADC, este estudo foi bem-sucedido. As nanopartículas foram obtidas em tamanho e com índice de polidispersão adequados para a aplicação desejada, sendo devidamente caracterizadas. Todas as estratégias foram bem-sucedidas em adsorver os anticorpos monoclonais selecionados as nanopartículas, com a utilização de estreptavidina e biotina sendo a opção mais interessante no momento, por demonstrar alto grau de adsorção e baixo grau de dessorção enquanto mantém uma orientação adequada dos anticorpos nas nanopartículas. A adsorção física, apesar de demonstrar maiores graus de adsorção, também dessorve em maiores taxas. Por fim, o ácido indol 3-butírico apresenta-se como uma possível opção viável, porém é necessário futuros estudos que controle outras variáveis sejam feitos.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Há um longo caminho a ser percorrido até que as técnicas sejam aperfeiçoadas. Esta pesquisa responde algumas perguntas e gera outras, abrindo espaço para sugestões para futuros trabalhos:

- Aperfeiçoar as técnicas de imobilização de anticorpos nas nanopartículas através da otimização das quantidades de reagentes empregados, a fim de evitar ou minimizar que ocorra adsorção física concomitante a adsorção química.
- Separar a técnica de adsorção química somente com Sulfo-NHS e EDC em duas etapas diferentes, uma primeira de ativação, somente com os dois compostos citados e, posteriormente, uma segunda etapa, realizando a incubação dos anticorpos e observar o comportamento.
- No que tange a estratégia utilizando o ácido indol 3-butírico, convém que seja desenvolvida uma estrutura que proteja o experimento da incidência de luz externa de forma mais eficiente, além de realizar algum tipo de controle de temperatura.
- Avaliar se a incorporação de um agente surfactante na solução de ressuspensão melhora o perfil de distribuição de tamanhos das nanopartículas após os ensaios

de adsorção, pois tudo indica que há a aglomeração destas após os experimentos.

- Realizar um ensaio imunobiológico específico ao Tocilizumab, como um ELISA, por exemplo, para avaliar se há a manutenção ou perda da atividade do anticorpo.
- Encapsular metotrexato ou algum outro medicamento antirreumático modificador da doença e avaliar o comportamento das estratégias de adsorção, assim como comparar a toxicidade celular com a administração separada do DMARD com Tocilizumab.

CAPÍTULO 6

Referências

- ADAMS, G. P., WEINER, L. M. "Monoclonal antibody therapy of cancer". **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, pp. 1147-1157, 2005.
- ALAMANOS, Y., DROSOS, A. A. "Epidemiology of adult rheumatoid arthritis". **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 3, pp. 130-136. 2005. Doi: 10.1016/j.autrev.2004.09.002.
- ALVES, N. J. "Antibody conjugation and formulation". **Antibody Therapeutics**, v. 2, n. 1, pp. 33-39, 2019. Doi: 10.1093/abt/tbz002.
- ALVES, N. J., CHAMPION, M. M., STEFANICK, J. F. *et al.* "Selective photocrosslinking of functional ligands to antibodies via the conserved nucleotide binding site". **Biomaterials**, v. 34, n. 22, pp. 5700-5710, 2013a. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.082.
- ALVES, N. J., KIZILTEPE, T., BILGICER, B. "Oriented surface immobilization of antibodies at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection". **Langmuir**, v. 28, n. 25, pp. 9640-9648, 2012. Doi: 10.1021/la301887s.
- ALVES, N. J., MUSTAFAOGLU, N., BILGICER, B. "Conjugation of a reactive thiol at the nucleotide binding site for site-specific antibody functionalization". **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 7, pp.1198-1202, 2014. Doi: 10.1021/bc500211d.
- ALVES, N. J., MUSTAFAOGLU, N., BILGICER, B. "Oriented antibody immobilization by site-specific UV photocrosslinking of biotin at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection". **Biosensors & Bioelectronics**, v. 49, pp. 387-393, 2013b. Doi: 10.1016/j.bios.2013.05.052.
- ANDREONI, W. **The physics of fullerene-based and fullerene-related materials**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. v. 23
- AWINO, J. K., ZHAO, Y. "Polymeric nanoparticle receptors as synthetic antibodies for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)". **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 1, n. 6, pp. 425-430, 2015. Doi: 10.1021/acsbomaterials.5b00042.
- BALKE, S. T., HAMIELEC, A. E., LECLAIR, B. P *et al.* "Gel permeation chromatography". **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 54-57, 1969.

- BAYDA, S., ADEEL, M., TUCCINARDI, T. *et al.* "The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine". **Molecules**, v. 25, n. 1, pp. 112, 2019. Doi: 10.3390/molecules25010112.
- BEE, J. S., CHIU, D., SAWICKI, S. *et al.* "Monoclonal antibody interactions with micro- and nanoparticles: adsorption, aggregation, and accelerated stress studies." **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 9, pp. 3218-3238, 2019. Doi: 10.1002/jps.21768.
- BETTENCOURT, A., ALMEIDA, A. J. "Poly (methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery". **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 4, pp. 353-367, 2012. Doi: 10.3109/02652048.2011.651500.
- BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, pp. 248-254, May 1976.
- BURMESTER, G. R., POPE, J. E. "Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis". **Lancet**, v. 389, n. 10086, pp. 2338-2348, 2017. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)31491-5.
- CAL, P. M., BERNARDES, G. J., GOIS, P. M. "Cysteine-selective reactions for antibody conjugation". **Angewandte Chemie**, v. 53, n. 40, pp. 10585-10587, 2014. Doi: 10.1002/anie.201405702.
- CAMPOS, I. M. F., FERRAZ, H. C., PINTO, J. C. "Production and Functionalization of P(MMA-co-AA) Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization". **Macromolecular Symposia**, v. 368, n. 1, pp. 70-77, 2016.
- CAMPOS, I., PAIVA, T., FERRAZ, H. *et al.* "Effects of miniemulsion operation conditions on the immobilization of BSA onto PMMA nanoparticles". **Polímeros**, v. 29, n. 3, pp. 1-10, 2019.
- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros**. 3. ed. São Paulo, Artliber, 2010.
- CAPEK, I. "Preparation of polymer-based nanomaterials". In: **Nanocomposite Structures and Dispersions**. [S. I.], Elsevier, pp. 175-265, 2019.
- CARPENTER, L., NORTON, S., NIKIPHOROU, E. *et al.* "Reductions in radiographic progression in early rheumatoid arthritis over twenty-five years: changing contribution from rheumatoid factor in two multicenter UK Inception Cohorts". **Arthritis Care & Research**, v. 69, n. 12, pp. 1809-1817, 2017. Doi: 10.1002/acr.23217.

- CASI, G., NERI, D. "Antibody-drug conjugates: basic concepts, examples and future perspectives". **Journal of Control Release**, v. 161, n. 2, pp. 422-428, 2012. Doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.026.
- CASTOR Jr., C. A., AZEVEDO, G., SANTOS Jr., J. G. F. *et al.* PMMA-Based Biomedical Applications: Manufacture and Uses. In: BERHARDT, L. V. (ed.). **Advances in Medicine and Biology**. [S. I.], Nova Science Publishers, 2019.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022, **National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (NCCDPHP)**. Disponível em <https://www.cdc.gov/chronicdisease/about/index.htm>. Acesso em: 12 out. 2023, 12:36.
- CHATZIDIONYSIOU, K., VOLLENHOVEN, R. F. "When to initiate and discontinue biologic treatments for rheumatoid arthritis?". **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 6, pp. 614-625, 2011. Doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02355.x.
- CHEN, J., QI, J., CHEN, C., *et al.* "Tocilizumab-Conjugated Polymer Nanoparticles for NIR-II Photoacoustic-Imaging-Guided Therapy of Rheumatoid Arthritis". **Advanced Materials**, v. 32, n. 37, e2003399, 2020. Doi: 10.1002/adma.202003399.
- CHEN, W., LIU, X., LIU, Y. *et al.* "Synthesis of PMMA and PMMA/PS nanoparticles by microemulsion polymerization with a new vapor monomer feeding system". **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, pp. 145-150, 2010. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.05.010.
- CHEVALIER, M. T., GONZALEZ, J., ALVAREZ, V. "Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices". **Journal of Controlled Release**, v. 49, pp. 187-190, 2015.
- CIOBANASU, C., SIEBRASSE, J. P., KUBITSCHKE, U. "Cell-Penetrating HIV1 TAT peptides can generate pores in model membranes". **Biophysical Journal**, v. 99, n. 1, pp. 153-162, 2010.
- CLOGSTON, J. D., PATRI, A. K. "Zeta potential measurement". **Methods in Molecular Biology**, v. 697, pp. 63-70, 2011. Doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- DAVIDOVITS, P. "Nanotechnology in Biology and Medicine". In: **Physics in Biology and Medicine**. [S. I.], Elsevier, pp. 293-305, 2019.
- DHIVYA, R., RANJANI, J., RAJENDHRAN, J., MAYANDI, J *et al.* "Enhancing the anti-gastric cancer activity of curcumin with biocompatible and pH sensitive PMMA-AA/ZnO nanoparticles". **Materials Science and Engineering: C**, v. 82, pp. 182-189, Jan. 2018. Doi: 10.1016/j.msec.2017.08.058.

- DWIVEDI, P., NAYAK, V., KOWSHIK, M. "Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis". **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 5, pp. 1416-1422, 2015. Doi: 10.1002/btpr.2147.
- ELSABAHY, M., WOOLEY, K. L. "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications". **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, pp. 2545-2561, 2012. Doi: 10.1039/c2cs15327k.
- FEUSER, P. E., GASPAR, P. C., RICCI-JÚNIOR, E. *et al.* "Synthesis and Characterization of Poly(Methyl Methacrylate) PMMA and Evaluation of Cytotoxicity for Biomedical Application". **Macromolecular Symposia**, v. 343, n. 1, pp. 65-69, Sep. 2014. Doi: 10.1002/masy.201300194.
- FONSECA, L. B. 2012. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Praziquantel para o tratamento da esquistossomose**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- FONSECA, L. B., NELE, M., VOLPATO, N. M. *et al.* "Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through "In Situ" Miniemulsion Polymerization". **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 7, n. 1, pp. 54-63, Jan. 2013.
- FU, Z., LI, S., HAN, S. *et al.* "Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy". **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, 2022. Doi: 10.1038/s41392-022-00947-7.
- GAO, D., GUO, X., ZHANG, X. *et al.* "Multifunctional phototheranostic nanomedicine for cancer imaging and treatment". **Materials Today Bio**, v. 5, n. October 2019, p. 100035, 2020. Doi: 10.1016/j.mtbio.2019.100035.
- GHAFFARIAN, R., HERREO, E. P., OH, H. *et al.* "Chitosan–Alginate Microcapsules Provide Gastric Protection and Intestinal Release of ICAM-1-Targeting Nanocarriers, Enabling GI Targeting In Vivo". **Advanced functional materials**, v. 26, n. 20, pp. 3382-3393, 2016. Doi: 10.1002/adfm.201600084.
- GHARIEH, A.; KHOEE, S.; MAHDAVIAN, A. R. "Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics". **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 269, pp. 152-186, Jul. 2019.
- GHERNAOUT, D. "Controlling coagulation process: from zeta potential to streaming potential". **American Journal of Environmental Protection**, v. 4, n. 5, pp. 16, 2015. Doi: 10.11648/j.ajeps.s.2015040501.12.
- GRABAREK, Z.; GERGELY, J. "Zero-Length crosslinking procedure with the use of active esters". **Analytical Biochemistry**, v. 185, n. 1, pp. 131-135, 1990.

- GRUBISIC, Z., REMPP, P., BENOIT, H. "A universal calibration for gel permeation chromatography". **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters**, v. 5, pp. 753-759, 1976. Doi: 10.1002/pol.1967.110050903.
- HERMANSON, G. T. "Zero-Length Crosslinkers". In: **Bioconjugate Techniques**. 3. ed. [S. I.], Elsevier, pp. 259-273, 2013.
- HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, E., SÁNCHEZ, V. C. "Potential utility of adenosine 5'-ester prodrugs to enhance its plasma half-life: Synthesis and molecular docking studies". **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 6, pp. 2325-2335, 2015. Doi: 10.1007/s00044-014-1299-z.
- HETLAND, M. L., HAAVARDSHOLM, E. A., RUDIN, A. *et al.* "Active conventional treatment and three different biological treatments in early rheumatoid arthritis: phase IV investigator initiated, randomised, observer blinded clinical trial". **BMJ**, v. 371, 2020. Doi:10.1136/bmj.m4328.
- HEUKERS, R., ALTINTAS, I., RAGHOENATH, S. *et al.* "Targeting hepatocyte growth factor receptor (Met) positive tumor cells using internalizing nanobody-decorated albumin nanoparticles". **Biomaterials**, v. 35, n. 1, pp. 601-610, 2014a. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.001.
- HEUKERS, R., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M., OLIVEIRA, S. "Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy". **Nanomedicine**, v. 10, n. 7, p. 1441-1451, 2014b. Doi: 10.1016/j.nano.2013.12.007.
- HOFFMANN, R. M., MELE, S., CHEUNG, A. *et al.* "Rapid conjugation of antibodies to toxins to select candidates for the development of anticancer Antibody-Drug Conjugates (ADCs)". **Scientific Reports**, v. 10, 8869, 2020. Doi: 10.1038/s41598-020-65860-x.
- HOSSEINI, S., IBRAHIM, F., DJORDJEVIC, I. *et al.* "Synthesis and processing of ELISA polymer substitute: The influence of surface chemistry and morphology on detection sensitivity". **Applied Surface Science**, v. 317, pp. 630-638, 2014. Doi: 10.1016/j.apsusc.2014.08.167.
- HUGHES-AUSTIN, J. M., DEANE, K. D., DERBER, L. A. *et al.* "Multiple cytokines and chemokines are associated with rheumatoid arthritis-related autoimmunity in first-degree relatives without rheumatoid arthritis: Studies of the Aetiology of Rheumatoid Arthritis (SERA)". **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 6, pp. 901-907, 2013. Doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201505.
- JARAI, B. M., KOLEWE, E., STILLMAN, Z. S. *et al.* "Polymeric nanoparticles". In: **Nanoparticles for biomedical applications**. [S. I.], Elsevier, pp. 303-324, 2020.

- JAWOREK, A. "Electrostatic micro- and nanoencapsulation and electroemulsification: a brief review". **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 7, pp. 443-468, 2008. Doi: 10.1080/02652040802049109.
- JEON, E. J., HAN, J. H., SEO, Y, *et al.* "Implementation of Systematic Bioanalysis of Antibody-Drug Conjugates for Preclinical Pharmacokinetic Study of Ado-Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in rats". **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, pp. 756, 2023. Doi: 10.3390/pharmaceutics15030756.
- JOSTOCK, T. "Expression of antibody in mammalian cells". In: AL-RUBEAI, M. (ed.). **Antibody Expression and Production**. [S. l.], Springer, p. 1-24, 2011.
- KHIALI, S., KHANI, E., ENTEZARI-MALEKI, T. "A comprehensive review of tocilizumab in COVID-19 acute respiratory distress syndrome". **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, n. 9, pp. 1131-1146, 2020. Doi: 10.1002/jcph.1693.
- KLINE, T., STEINER, A. R., PENTA, K. *et al.* "Methods to make homogenous antibody drug conjugates". **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 11, pp. 3480-3493, 2015. Doi: 10.1007/s11095-014-1596-8.
- KLINGELER, R., SIM, R. B. **Carbon nanotubes for biomedical applications**. Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 4.
- KÖHLER, G. MILSTEIN, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". **Nature**, v. 256, n. 5517, pp. 495-497, 1975. Doi: 10.1038/256495a0.
- KUMAR, N., KUMBHAT, S. **Essentials in nanoscience & nanotechnology**. [S. l.], Wiley, 2016.
- KUMARI, A., YADAV, S. K., YADAV, S. C. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems". **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, pp. 1-18, 2010. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- KURKÓ, J., BESENYEI T, LAKI, J. *et al.* "Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review". **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 45, n. 2, pp. 170-179, 2013. Doi: 10.1007/s12016-012-8346-7.
- LEMPERLE, G., ROMANO, J. J., BUSSO, M. "Soft tissue augmentation with artecoll: 10-year history, indications, techniques, and complications". **Dermatologic Surgery**, v. 29, n. 6, pp. 573-587, June 2003. Doi: 10.1046/j.1524-4725.2003.29140.x.
- LIM, K., HAMID, Z. A. A. "Polymer nanoparticle carriers in drug delivery systems". In: **Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery**. [S. l.], Elsevier, pp. 217-237, 2018.

- LIMA, E. M., RIBEIRO JR., E. 2021. **Vacina Pfizer para o combate ao SARS-CoV-2**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- LORCA, B. S. E S. 2012. **Desenvolvimento de formulação fotoprotetora contendo nanopartículas poliméricas com filtro solar**. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- LORCA, B. S. S., BESSA E. S., NELE, M. *et al.* "Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization". **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 246-250, Sep. 2012.
- LUCAS, C. J., DIMMITT, S. B., MARTIN, J. H. "Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis - a review". **British Journal of Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 85, n. 10, pp. 2228-2234, 2019. Doi: 10.1111/bcp.14057.
- LUCENTE, A. G. B. 2008. **Estudo da copolimerização em mini emulsão de metacrilato de metila/metacrilato de etil**. Dissertação de M.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MACHADO, F., LIMA, E. L., PINTO, J. C. "Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão". **Polímeros**, v. 17, n. 2, pp. 166-179, June 2007.
- MALHADO, M., PINTO, D. P., SILVA, A. C. A. *et al.* "Preclinical pharmacokinetic evaluation of praziquantel loaded in poly (methyl methacrylate) nanoparticle using a HPLC-MS/MS". **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, n. 2, pp. 405-412, Jan. 2016. Doi: 10.1016/j.jpba.2015.09.023.
- MANGIA, L. H. R. 2018. **Encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas de P(MMA-co-AA) funcionalizadas para tratamento de doenças neurodegenerativas**. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MANO, E. B., MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo, Blucher, 1999.
- MATTOS, G. C. 2021. **Análise comparativa de estratégias para funcionalização de nanopartículas poliméricas com biomoléculas**. Dissertação M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MATTOS, G. C., CAMPOS, I. M. F., MARQUES, M. F. *et al.* "Acrylic polymer nanoparticles: cytotoxicity, cell permeability, and biodistribution in mice after intravenous injection". **Journal of Nanoparticle Research**, v. 25, n. 35, 2023. Doi: 10.1007/s11051-023-05681-x.

- MCINNES, I. B., BUCKLEY, C. D., ISAACS, J. D. "Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape". **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, pp. 63-68, 2016. Doi: 10.1038/nrrheum.2015.171.
- MEDINA, Y. F., RUÍZ-GAVIRIA, R. E., BUITRAGO-LOPEZ, A. *et al.* "Physical articular examination in the activity of rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature : Systematic review of the literature regarding physical examination in rheumatoid arthritis". **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 6, pp. 1457-1464, 2018. Doi: 10.1007/s10067-018-4015-4.
- MEEKER, T. C., LOWDER, J., MALONEY, D. G. *et al.* "A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy". **Blood**, v. 65, n. 6, pp. 1349-1363, 1985.
- MENDES, A., HUBBER, I., SIQUEIRA, M. *et al.* "Preparation and Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) nanoparticles for drug encapsulation". **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, pp. 34-40, Sep. 2012. Doi: 10.1002/masy.201100248.
- MOREIRA, T. S. A., OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* "Synthesis of nanoparticles loaded with tamoxifen by in situ miniemulsion RAFT polymerization". **Macromolecular Symposia**, v. 344, n. 1, pp. 101-107, 2014. Doi: 10.1002/masy.201400025.
- MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues". **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, Feb. 2008.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre, Artmed, 2010.
- OLDFIELD, V., DHILLON, S., PLOSKER, G. L. "Tocilizumab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis". **Drugs**, v. 69, n. 5, pp. 609-632, 2009. Doi: 10.2165/00003495-200969050-00007.
- PAIVA, T., MELO, P., PINTO, J. C. "Comparative analysis of sunscreen nanoencapsulation processes". **Macromolecular Symposia**, v. 368, n. 1, pp. 60-69, Oct. 2016.
- PANAHI-BAZAZ, M. R., ZAMANI, M., ABAZAR, B. "Hydrophilic acrylic versus PMMA intraocular lens implantation in pediatric cataract surgery". **Journal of Ophthalmic and Vision Research**, v. 4, n. 4, pp. 201-207, 2014.
- PASUT, G., VERONESE, F. M. "PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 13, pp. 1177-1188, 2009. Doi: 10.1016/j.addr.2009.02.010.

- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. *et al.* **Introduction to spectroscopy**. 4. ed. [S. l.], Brooks/Cole, 2009.
- PAZO, C., NAWAZ, K., WEBSTER, R. M. "The oncology market for antibody-drug conjugates". **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 8, pp. 583-584, 2021. Doi: 10.1038/d41573-021-00054-2.
- PEIXOTO, A. C. B. 2013. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- PEIXOTO, A. C. B., CAMPOS, I. M. F., FERRAZ, H. C. *et al.* "Use of Hydrophilic Monomers to Avoid Secondary Particle Nucleation in Miniemulsion Polymerizations of Methyl Methacrylate". **Journal of Research Updates in Polymer Science**, v. 5, n. 2, pp. 60-71, Aug. 2016. Doi: 10.6000/1929-5995.2016.05.02.2.
- RAMOS, I. M. F. C. 2018. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central**. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- RAO, K. S. *et al.* "TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs". **Biomaterials**, v. 29, n. 33, pp. 4429-4438, Nov. 2008. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.004.
- REIS, K. R. *et al.* "In vitro wear resistance of three types of polymethyl methacrylate denture teeth". **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 3, pp. 176-180, June 2008. Doi: 10.1590/s1678-77572008000300003.
- ROGERS, L. M., VEERAMANI, S., WEINER, G. J. "Complement in monoclonal antibody therapy of cancer". **Immunologic Research**, v. 59, n. 1-3, pp. 203-210, 2014. Doi: 10.1007/s12026-014-8542-z.
- ROQUE, A. C. A., LOWE, C. R., TAIPA, M. A. "Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification". **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, pp. 639-654, May 2004. Doi: 10.1021/bp030070k.
- SAADE, H., GUILLÉN, M. L., ROMERO, J. C. *et al.* "Biocompatible and Biodegradable Ultrafine Nanoparticles of Poly(Methyl Methacrylate-co-Methacrylic Acid) Prepared via Semicontinuous Heterophase Polymerization: Kinetics and Product Characterization". **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, pp. 1-8, 2016. Doi: 10.1155/2016/7674620.
- SANDHYARANI, N. "Surface modification methods for electrochemical biosensors". In: **Electrochemical Biosensors**. [S. l.], Elsevier Inc., pp. 45-75, 2019.

- SCHEINECKER, C., SMOLEN, J., YASOTHAN, U., *et al.* "Tocilizumab". **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 4, pp. 273-274, 2009. Doi: 10.1038/nrd2863.
- SCOTT, D. L., SMITH, C., KINGSLEY, G. "Joint damage and disability in rheumatoid arthritis: an updated systematic review". **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 21, n. 5, Suppl. 31, pp. S20-S27, 2003.
- SHASTRY, M., GUPTA, A., CHANDARLAPATY, S. *et al.* "Rise of antibody-drug conjugates: the present and future". **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 43, 2023. Doi: 10.1200/EDBK_390094.
- SHEN, B. Q., XU, K., LIU, L. *et al.* "Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates". **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 2, pp. 184-189, 2012. Doi: 10.1038/nbt.2108.
- SHEN, C. "Quantification and analysis of proteins". **Diagnostic Molecular Biology Book**, pp. 187-214, 2019. Doi: 10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0.
- SHEPPARD, M., LASKOU, F., STAPLETON, P. P. *et al.* "Tocilizumab (Actemra)". **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 9, pp. 1972-1988, 2017. Doi: 10.1080/21645515.2017.1316909.
- SINGH, S., KUMAR, N. K., DWIWEDI, P. *et al.* "Monoclonal antibodies: a review". **Current Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 2, pp. 85-99, 2018. Doi: 10.2174/1574884712666170809124728.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T. *et al.* "Measurement of protein using bicinchoninic acid". **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, pp. 76-85, 1985. Doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. Published correction appears in *Anal Biochem*, v. 163, n. 1, pp. 279, May 1987.
- SOUSA, F., CASTRO, P., FONTE, P. *et al.* "Nanoparticles for the delivery of therapeutic antibodies: Dogma or promising strategy?". **Expert Opinion on Drug Delivery**, 14(10), 1163–1176, 2016. Doi: 10.1080/17425247.2017.1273345.
- SOUSA, F., CRUZ, A., PINTO, I. M. *et al.* "Nanoparticles provide long-term stability of bevacizumab preserving its antiangiogenic activity". **Acta Biomaterialia**, v. 78, pp. 285-295, 2018. Doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.040.
- SPEARMAN, M., DIONNE, B., BUTLER, M. "The role of glycosylation in therapeutic antibodies". In: AL-RUBEAI, M. (ed.). **Antibody expression and production**. [S. l.], Springer, pp. 251-292, 2011.
- STROHL, W. R. "Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters". **BioDrugs**, v. 29, n. 4, pp. 215-239, 2015. Doi: 10.1007/s40259-015-0133-6.

- SULEIMAN, E., MAYER, J., LEHNER, E. *et al.* “Conjugation of Native-Like HIV-1 Envelope Trimers onto Liposomes Using EDC/Sulfo-NHS Chemistry: Requirements and Limitations”. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, 2020. Doi: 10.3390/pharmaceutics12100979.
- SUNSHINE, J. C., PALLER, A. S. “Which nanobasics should be taught in medical schools?”. **AMA Journal of Ethics**, v. 21, n. 4, e337-346, Apr. 2019. doi: 10.1001/amajethics.2019.337.
- SUR, S., RATHORE, A., DAVE, V. *et al.* “Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for eficiente drug delivery system”. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, Oct. 2019. Doi: 10.1016/j.nanoso.2019.100397.
- SUZUKI, M., HASHIZUME, M., YOSHIDA, H. *et al.* “Anti-inflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody: effect on the expression of chemokine and adhesion molecule”. **Rheumatology International**, v. 30, n. 3, pp. 309-315, 2010. Doi: 10.1007/s00296-009-0953-0.
- SWITALKSI, K., FAN, J., CHU, M. *et al.* “Direct measurement of Stokes-Einstein diffusion of Cowpea mosaic vírus with 19µs-resolved XPCS”. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 29, pp. 1429-1435, 2022. Doi: 10.1107/S1600577522008402.
- TAMASHIRO, W. M.; AUGUSTO, E. F. P. “Monoclonal antibodies”. In: CASTILHO, L. R. *et al.* (ed.) **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. Nova York, Taylor & Francis, p. 409-434, 2008.
- THIRAMANAS, R., JANGPATARAPONGSA, K., ASAWAPIROM, U. *et al.* “PS/AA-modified nanoparticles for malaria detection”. **Microbial Biotechnology**, v. 6, pp. 406-413, 2013. Doi: 10.1111/1751-7915.12021.
- TORCHILIN, V. P. “Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers”. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, pp. 145-160, 2005. Doi: 10.1038/nrd1632.
- TRINO, L. D. 2018. **Funcionalização de superfícies e estudo de adsorção de biomoléculas em óxidos metálicos**. Tese de D.Sc., Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Marília, São Paulo.
- ULU, A.; KOYTEPE, S.; ATES, B. “Design of starch functionalized biodegradable P(MAA-co-MMA) as carrier matrix for I -asparaginase immobilization”. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, pp. 559-572, Nov. 2016.
- UNITED NATIONS, 2022, **Life expectancy at birth for both sexes combined (years)**. Disponível em: <https://data.un.org/Data.aspx?d=PopDiv&f=variableID%3a68>. Acesso em: 15 out. 2023, 14:38.

- VAISHYA, R., CHAUHAN, M.; VAISH, A. "Bone cement". **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v. 4, n. 4, pp. 157-163, Dec. 2013. Doi: 10.1016/j.jcot.2013.11.005.
- VAN HERK, A. M. "Emulsion (Homo)polymerization". In: **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 688-695, 2015. v. 44.
- VAN LITH, S. A., VAN DUIJNHOFEN, S. M., NAVIS, A. C. *et al.* "Legomedicine-A Versatile Chemo-Enzymatic Approach for the Preparation of Targeted Dual-Labeled Llama Antibody-Nanoparticle Conjugates". **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 2, pp. 539-548, 2017. Doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00638.
- VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles". **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, pp. 1025-1058, May 2009. Doi: 10.1007/s11095-008-9800-3.
- VENKITESHWARAN, A. "Tocilizumab". **MAbs**, v. 1, n. 5, pp. 432-438, 2009. Doi: 10.4161/mabs.1.5.9497.
- VERMA, S., DOMB, A. J., KUMAR, N. "Nanomaterials for regenerative medicine". **Nanomedicine**, v. 6, n. 1, pp. 157-181, 2011. Doi: 10.2217/nnm.10.146.
- VIDARSSON, G., DEKKERS, G., RISPENS, T. "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions". **Frontiers in Immunology**, v. 5, 520, 2014. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- WAY, D. V., VRAIDO, R. S., REIS, S. A. *et al.* "Miniemulsion RAFT copolymerization of MMA with acrylic acid and methacrylic acid and bioconjugation with BSA". **Nanomaterials**, v. 9, n. 6, 2019. Doi: 10.3390/nano9060828.
- WEINER, G. J. "Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer". **Immunologic Research**, v. 39, n. 1-3, pp. 271-278, 2007. Doi: 10.1007/s12026-007-0073-4.
- WOLFRAM, J., SURI, K., Yang, Y. *et al.* Shrinkage of pegylated and non-pegylated liposomes in serum. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, pp. 294-300, 2014. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.10.009.
- YAN, Q., ZHENG, H. N., LI, K. *et al.* "EDC/NHS activation mechanism of polymethacrylic acid: Anhydride versus NHS-ester". **RSC Advances**, v. 5, n. 86, pp. 69939-69947, 2015.
- ZHANG, X. P., SUN, J. G., YAO, J. *et al.* "Effect of nanoencapsulation using poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) on anti-angiogenic activity of bevacizumab for ocular

angiogenesis therapy". **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, pp. 1056-1063, 2018. Doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.092.

ZHENG, L., VANCHINATHAN, V., DALAL, R. *et al.* "Biocompatibility of poly(ethylene glycol) and poly(acrylic acid) interpenetrating network hydrogel by intrastromal implantation in rabbit cornea". **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 10, pp. 3157-3165, Oct. 2015. Doi: 10.1002/jbm.a.35453.

ZHIWEN, F., LI, S., HAN, S. *et al.* "Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy". **Signal Transduction and Target Therapy**, v. 7, n. 1, Mar. 2022. Doi: 10.1038/s41392-022-00947-7.