



DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE RIVASTIGMINA  
USADA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Lys Hamond Regua Mangia

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Maria Inês Ré

Rio de Janeiro

Dezembro de 2022

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE RIVASTIGMINA  
USADA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Lys Hamond Regua Mangia

TESE 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 DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof<sup>a</sup>. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Ré, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Percebom, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Ariane de Jesus Sousa Batista, D.Sc.

---

Prof Príamo Albuquerque Melo Junior, D.Sc.

---

Dr.<sup>a</sup> Suênia de Paiva Lacerda, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2022

Mangia, Lys Hamond Regua

Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas  
Funcionalizadas para Liberação Controlada de Rivastigmina  
usada no Tratamento da Doença de Alzheimer / Lys Hamond  
Regua Mangia. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2022.

XXIII, 201 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Maria Inês Ré

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia  
Química, 2022.

Referências Bibliográficas: p. 166-187.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Funcionalização de polímeros.
3. Encapsulamento de fármaco. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.*  
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de  
Engenharia Química. III. Título.

## DEDICATÓRIA

A meus pais, Adriana e Luiz,  
e a minha irmã, Louise,  
por sempre me incentivarem e me apoiarem.

## **AGRADECIMENTOS**

Trabalhar nesta pesquisa e escrever esta tese só foi possível, pois tenho ao meu lado pessoas incríveis.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a minha família, meus pais, Adriana e Luiz, e minha irmã, Louise, que sempre me incentivaram e me motivaram durante todo esse caminho. São exemplos de amor, carinho e compreensão e são a minha base de vida e caráter. Especialmente, queria agradecer a minha mãe, que sempre foi minha grande incentivadora e é meu grande exemplo de cientista e mulher. Claro que não poderia deixar de mencionar também a minha cãopanheira Mili que tanto me acompanhou nos períodos de estudos e escrita.

Agradeço também os meus orientadores pelo suporte emocional e profissional dados continuamente no decorrer desta tese. A Professora Helen pela grande prontidão, disponibilidade em me assistir, incentivo frequente e discussões que muito me ajudaram no desenvolvimento das hipóteses.

O Professor José Carlos pela motivação constante, debates científicos e explicações desde a teoria até a prática dos fenômenos envolvidos, que foram essenciais para a condução deste trabalho.

A Professora Maria Inês que me recebeu muito bem num país estrangeiro me fazendo ser acolhida pessoalmente e profissionalmente, o que permitiu a condução de um trabalho experimental eficiente mesmo após um período pandêmico controlado.

Reconheço também a importância dos meus colegas de turma de mestrado que também seguiram no doutorado comigo: o Daniel, a Maria Rosa, a Victória e o Vitor. Eles dividiram comigo não só as ansiedades e preocupações do doutorado, como também os alívios e alegrias de sucessos de qualificação e experimentos que deram certo! Não posso esquecer também dos colegas que participaram comigo da comissão da Escola Piloto, a Carol Gaioto, o Marcellus e especialmente a Mary, que tanto me ajudou a cumprir a minha função na equipe.

Agradeço também os meus amigos dos laboratórios EngePol, I-140 e LABEFIT por dividirem comigo o dia a dia dos experimentos sempre como muita leveza e humor. Particularmente, agradeço a Flávia por embarcar comigo em projetos movidos pela

curiosidade científica, o Eduardo pelo grande incentivo para ir à França, o Prof João Vitor pelas conversas encorajadoras. Não posso deixar de mencionar a Jéssica que foi minha grande parceira no doutorado e em projetos de pesquisa, e com quem tenho grande amizade. E, não posso esquecer dos meus colegas de projetos, a Juliana, o Max e Mateus e os estagiários Dani e Alcimar que também dividiram momentos importantes e de tensão (haha). Agradeço também aqueles que participaram de verdadeiras empreitadas científicas como a Camila e o Marcel, sempre movidos pela ciência, curiosidade e habilidade em ajudar. Deixo também aqui o meu reconhecimento todos os outros colegas, que viraram grandes amigos e me ajudaram muito todos os dias como a Gabi, o Lucas, a Luciana, a Martina, a Nathany, o Rafa, o Rafael e a Stefanni. As meninas do Engepol (Larissa, Nathalie, Natasha e Vanessa) pelo carinho e disponibilidade de sempre, e apoio nas caracterizações.

Os amigos que fiz no RAPSODEE, que fizeram a minha estadia na França uma jornada leve e muito proveitosa. Agradeço a calorosa recepção da Akaber, Carla, Gweni, Hayfa, Igor, Jennifer, Maria Thereza, Marine, Tin, Thomas, Vincent e, em especial, a Marie-Anne que foi minha companheira de aventuras nas cidadezinhas da França. A todo apoio que recebi da Fabienne Espitalier e também do corpo técnico Angélique, Christine, Laurène, Laurent, Sylvie e Philippe nas caracterizações e interpretações de resultados. Merci beaucoup!!

As Dr<sup>a</sup> Isabelle Baudrimont e a Dr<sup>a</sup> Thais Porto Ribeiro do Centre de Recherche Cardio Thoracique de Bordeaux por serem muito receptivas e possibilitarem uma valiosa parceria neste trabalho. Agradeço também o apoio do Laboratório Multiusuário de RMN de sólidos/IQ pelas análises.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudos que possibilitaram a condução desta tese.

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

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE RIVASTIGMINA  
USADA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Lys Hamond Regua Mangia

Dezembro/2022

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Maria Inês Ré

Programa: Engenharia Química

O uso de nanopartículas pode aperfeiçoar o tratamento de doenças, em especial as de difícil alcance, como disfunções cerebrais. Por isso, o presente trabalho visou ao desenvolvimento de nanopartículas biocompatíveis carreadoras de rivastigmina, fármaco aprovado no tratamento da Doença de Alzheimer, para liberação controlada e sítio-específica ao cérebro. Metacrilato de metila (MMA) e comonômeros funcionais (ácido acrílico (AA), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e acrilato de butila (BA) foram escolhidos para síntese das nanopartículas por polimerização em miniemulsão. A combinação de surfactantes resultou em melhor estabilidade do látex e controle de tamanho de partícula. O encapsulamento *in situ* de 0,5% m/m de fármaco não modificou o tamanho e foi mais eficiente (90%) em materiais sem AA e HEMA. A imobilização de aminoácido e proteínas mostrou a versatilidade e superioridade dos copolímeros em relação ao PMMA. Ensaio de liberação exibiram perfil sustentado com destaque dos copolímeros liofilizados e mecanismo preferencial de difusão clássica. Ensaio em células endoteliais humanas derivadas da artéria pulmonar mostraram elevada viabilidade celular. Assim, mostrou-se que as nanopartículas produzidas apresentam grande potencial para incorporar ligantes e carrear rivastigmina através de barreiras fisiológicas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF FUNCTIONALIZED POLYMERIC NANOPARTICLES FOR  
CONTROLLED RELEASE OF RIVASTIGMINE  
USED FOR TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Lys Hamond Regua Mangia

December/2022

Advisors: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Maria Inês Ré

Department: Chemical Engineering

Nanoparticles can enhance the treatment of diseases, especially when the diseased tissue is hard to access, as in the case of brain. For this reason, the present work aimed at developing biocompatible nanoparticles loaded with rivastigmine, a drug approved for the treatment of the Alzheimer's Disease, for sustained release of the drug to the brain. Methyl methacrylate (MMA), acrylic acid (AA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and butyl acrylate (BA) were the comonomers selected for synthesis of nanoparticles through miniemulsion polymerization. The combination of the surfactants provided the better latex stability and allowed the particle size control. The in-situ encapsulation of 0.5% w/w drug was very efficient (90%) in absence of AA and HEMA and did not alter particle size. The immobilization of amino acid and proteins confirmed the versatility and superiority of the copolymers when compared to the PMMA. Release studies displayed sustained, and diffusion driven profiles, with higher release rates obtained with the lyophilized copolymers. Additionally, assays performed in human endothelial cells derived from pulmonary artery showed high cell viability. Thus, it has been shown that the produced nanoparticles can be potentially used to incorporate ligands and carry rivastigmine through physiological barriers.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xxi
Capítulo 1. Introdução .....	1
1.1 Contextualização.....	1
1.2 Os grupos de pesquisa.....	2
1.3 Objetivo .....	4
1.3.1 Objetivos específicos .....	4
1.4 Estrutura da tese .....	5
Capítulo 2. Revisão Teórica e Bibliográfica .....	6
2.1 Nanomateriais e vantagens de uso na área médica .....	6
2.2 A doença de Alzheimer.....	7
2.3 Nanomateriais para entrega de fármacos ao cérebro .....	10
2.4 Nanopartículas poliméricas.....	14
2.4.1 Tipos de nanocarreadores .....	14
2.4.2 Síntese de nanopartículas .....	17
2.4.3 Funcionalização de nanopartículas .....	21
2.4.4 Mecanismos de liberação controlada em nanopartículas.....	27
2.4.5 Avaliação da resposta biológica de nanopartículas .....	33
2.5 Nanopartículas poliméricas carreadoras de rivastigmina .....	36
2.6 Considerações finais .....	43
Capítulo 3. Materiais e Métodos .....	45
3.1 Materiais .....	46
3.2 Métodos .....	49
3.2.1 Escolha de surfactante .....	49
3.2.2 Efeito do número HLB .....	53

3.2.3	Produção de nanopartículas poliméricas.....	55
3.2.4	Funcionalização das nanopartículas.....	59
3.2.5	Avaliação <i>in vitro</i> .....	60
3.2.5.1	Liberção do fármaco .....	60
3.2.5.2	Análise de segurança com ensaio biológico .....	62
3.2.6	Caracterização físico-química das nanopartículas.....	63
3.2.6.1	. Composição química .....	63
3.2.6.2	Conversão de monômero .....	64
3.2.6.3	Eficiência de encapsulamento (%EE) de fármaco.....	65
3.2.6.4	Massa molar.....	66
3.2.6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	66
3.2.6.6	Tamanho de partícula e potencial zeta .....	66
3.2.6.7	Temperatura de decomposição e temperatura de transição vítrea .....	67
Capítulo 4. Estudo de estabilidade de emulsões de MMA e da síntese de nanopartículas de PMMA.....		69
4.1	Escolha de surfactante .....	69
4.2	Efeito do número HLB .....	82
4.3	Produção de nanopartículas poliméricas de PMMA por polimerização em miniemulsão .....	90
Capítulo 5. Encapsulamento <i>in situ</i> de rivastigmina, síntese de nanopartículas de copolímeros funcionais e funcionalização de nanopartículas carreadoras de fármaco ..		99
5.1	Encapsulamento <i>in situ</i> de rivastigmina em PMMA .....	99
5.2	Copolimerização de MMA com AA, BA e HEMA.....	109
5.3	Encapsulamento <i>in situ</i> de RBL em copolímeros funcionais .....	122
5.4	Funcionalização das nanopartículas de copolímeros com biomoléculas ..	134
5.4.1	Funcionalização de copolímeros brancos com lisina.....	134

5.4.2	Funcionalização de copolímeros funcionais contendo rivastigmina com biomoléculas .....	137
Capítulo 6.	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> de fármaco encapsulado e estudo de segurança de nanopartículas .....	141
6.1	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	141
6.1.1	Desenvolvimento de um protocolo experimental para ensaio de liberação <i>in vitro</i> de RBL encapsulada em nanopartículas poliméricas .....	141
6.1.2	. Avaliação de cinética de liberação <i>in vitro</i> de RBL encapsulada .....	144
6.2	Segurança das nanopartículas poliméricas .....	158
Capítulo 7.	Considerações Finais .....	161
7.1	Conclusões .....	161
7.2	Sugestões de ensaios futuros.....	164
Capítulo 8.	Referências Bibliográficas .....	166
Apêndice 1.	Dados de TSI, $\mu_{cla}$ e $\mu_{cre}$ da etapa “Escolha de Surfactante” .....	188
Apêndice 2.	Dados de TSI, $\mu_{cla}$ , $\mu_{cre}$ e índice de clarificação da etapa “Efeito do número HLB” .....	189
Apêndice 3.	Ensaio de solubilidade de rivastigmina .....	190
Apêndice 4.	Comparação entre os espectros de $^1\text{H-RMN}$ de BA, HEMA e P(MMA-BA-HEMA) .....	191
Apêndice 5.	Composição dos copolímeros por $^1\text{H-RMN}$ .....	192
Apêndice 6.	Tg dos copolímeros calculados pelo espectro de DSC.....	193
Apêndice 7.	Cálculo teórico de Tg a partir da regra da aditividade e da equação de Fox .....	195
Apêndice 8.	Quantificação de RBL por HPLC.....	196
Apêndice 9.	Dados RBL liberada no ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	198
Apêndice 10.	Modelos matemáticos, métricas de qualidade de ajuste e eficiências de dissolução aplicados aos dados experimentais da liberação <i>in vitro</i> de RBL .....	199

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Fórmulas químicas dos inibidores enzimáticos atualmente utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer. ....	10
Figura 2.2. Representação esquemática dos diferentes transportes na barreira hematoencefálica. Adaptado de ARYA <i>et al.</i> (2019). ....	11
Figura 2.3. Estruturas de diferentes nanocarreadores poliméricos. Adaptado de VENDITTI (2019) e EL-SAY e EL-SAWY (2017). ....	14
Figura 2.4. Esquema representativo da metodologia de polimerização em miniemulsão. Adaptado de ANTONIETTI e LANDFESTER (2002). ....	20
Figura 2.5. Principais mecanismos de imobilização de biomoléculas em superfícies poliméricas. Adaptado de GODDARD e HOTCHKISS (2007). ....	23
Figura 2.6. Perfis característicos de liberação de fármacos. ....	28
Figura 2.7. Representação dos mecanismos de liberação de fármacos em nanopartículas. Adaptado de LEE e YEO (2015). ....	29
Figura 2.8. Resultados da pesquisa bibliográfica para o número de documentos originais publicados para nanopartículas e doença de Alzheimer na base de dados SCOPUS no período compreendido entre 2002 e 2022. ....	36
Figura 2.9. Visão global dos trabalhos que investigaram o encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas até o ano de 2022, levando em consideração o material da partícula e a natureza do fármaco. ....	38
Figura 3.1. Representação esquemática das metodologias adotadas no desenvolvimento da tese de doutorado. ....	45
Figura 4.1. Variação de backscattering versus altura (mm) de emulsões contendo 1% <i>m/m</i> de surfactante e 10% <i>m/m</i> de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). ....	72
Figura 4.2. Variação de <i>backscattering</i> versus altura (mm) de emulsões contendo 1% <i>m/m</i> de surfactante e 25% <i>m/m</i> de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). ....	74
Figura 4.3. Variação de backscattering versus altura (mm) de emulsões contendo 5% <i>m/m</i> de surfactante e 10% <i>m/m</i> de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). ....	75

Figura 4.4. Variação de <i>backscattering</i> versus altura (mm) de emulsões contendo 5% m/m de surfactante e 25% m/m de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min).....	77
Figura 4.5. Efeito entre razão de surfactante e massa de monômero, usando o surfactante Tween80 como exemplo.....	78
Figura 4.6. Índices quantitativos para avaliação de estabilidade de emulsões MMA em água com diferentes surfactantes: A- TSI, B- taxa média de clarificação e C – taxa média de cremeação.....	80
Figura 4.7. Perfil de variação de <i>backscattering</i> versus altura (mm) de emulsões contendo 1% m/m de surfactante e variando HLB. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). Adaptado de MANGIA <i>et al</i> (2022).....	84
Figura 4.8. Perfil de variação de <i>backscattering</i> versus altura (mm) de emulsões contendo 3% m/m de surfactante e variando HLB. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). Adaptado de MANGIA <i>et al</i> (2022).....	86
Figura 4.9. Perfil de variação de <i>backscattering</i> versus altura (mm) de emulsões contendo 5% m/m de surfactante e variando HLB. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). Adaptado de MANGIA <i>et al</i> (2022).....	88
Figura 4.10. Índices quantitativos para avaliação de estabilidade de emulsões MMA em água com diferentes valores de HLB: A- TSI, B- índice de clarificação, C- taxa média de cremeação e D – taxa média de clarificação (adaptado de MANGIA <i>et al.</i> , 2022).....	89
Figura 4.11. Trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações em miniemulsão conduzidas com diferentes proporções mássicas de surfactante e variados valores de HLB, adaptado de MANGIA <i>et al</i> (2022). O padrão comparativo "SDS puro" foi retirado de MANGIA <i>et al</i> (2021). Nesse caso, a concentração do SDS puro foi mantida em 5%.....	92
Figura 4.12. Registro fotográfico do látex polimérico obtido usando 3% m/m de surfactante. Notam-se duas fases imiscíveis, evidenciado pelo frasco do meio. A amostra à direita utilizou SDS em sua composição e destaca fase única.....	94
Figura 4.13. Distribuições de tamanho de partícula de látex de PMMA preparado com diferentes valores de HLB: A: 1 % m/m de surfactante; B: 3 % m/m de surfactante;	

C: 5 %m/m de surfactante. As linhas pontilhadas indicam a mistura de com SDS, adaptado de MANGIA *et al* (2022). As linhas tracejadas representam SDS puro, retirado de MANGIA *et al* (2021). ..... 95

Figura 5.1. Trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações de encapsulamento *in situ* de RBL em PMMA com variados valores de HLB e 30% de SDS. .... 101

Figura 5.2. Distribuição de tamanhos de partícula ao longo das 2 horas de polimerização em miniemulsão de MMA com e sem encapsulamento *in situ* de RBL com HLB variados e 30% de SDS. A- branco PMMA usando HLB 6 e 30% de SDS, B – branco PMMA usando HLB 8 e 30% de SDS, C- encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL usando HLB 6 e 30 % de SDS e D – encapsulamento *in situ* de 1% de RBL usando HLB 8 e 30% de SDS. .... 102

Figura 5.3. Micrografias eletrônicas de varredura do homopolímero PMMA produzido por miniemulsão conduzida com HLB6 e 30% de SDS: A- material branco (sem fármaco) e B- material sintetizado com encapsulamento *in situ* de 0,5% de fármaco. .... 105

Figura 5.4. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H para PMMA branco e para PMMA com encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL, ambos produzidos em miniemulsão com HLB6 e 30% de SDS. .... 106

Figura 5.5. Análises térmicas realizadas para PMMA branco e para PMMA com encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL, ambos produzidos em miniemulsão com HLB6 e 30% de SDS. A - Termograma de TGA de perda de massa, B- Derivada de perda de massa de TGA, e C- curvas de DSC com os valores de Tg calculados..... 107

Figura 5.6. Fórmula estrutural dos comonômeros utilizados para adicionar novas funcionalidades ao polímero base PMMA. .... 109

Figura 5.7. Trajetórias de conversão de monômero obtidas para os ensaios de copolimerização em miniemulsão. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação de copolimerização P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. .... 110

Figura 5.8. Distribuições de tamanhos de partícula ao longo das 2 horas de reação para os ensaios de copolimerização em miniemulsão. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS com exceção da reação de copolimerização P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. .... 111

Figura 5.9. Distribuições de massas molares obtidas para os polímeros finais dos ensaios de copolimerização em miniemulsão. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS com exceção da reação de copolimerização P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. ....	113
Figura 5.10. Espectros de FTIR obtidos para os materiais obtidos nos ensaios de copolimerização em miniemulsão. A- Espectro de FTIR completo. B- Zoom na região <i>fingerprint</i> entre 2000 cm <sup>-1</sup> e 650 cm <sup>-1</sup> . Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. ....	114
Figura 5.11. Espectros de <sup>1</sup> H-RMN obtidos para os copolímeros. A- Espectro completo. B- Zoom na região de análise de copolimerização. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. ....	115
Figura 5.12. Comparação entre frações molares de MMA alimentadas no reator e a calculadas com base nos espectros de <sup>1</sup> H-RMN dos copolímeros investigados. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. ....	118
Figura 5.13. Análises térmicas realizadas para PMMA e copolímeros contendo BA. A - Termograma de TGA de perda de massa, B- Derivada de perda de massa de TGA, e C- curvas de DSC com os valores de Tg calculados. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. ....	119
Figura 5.14. Micrografias eletrônicas de varredura no zoom 12000x para A - homopolímero PMMA, B - P(MMA-BA), C- P(MMA-BA-AA) e D- P(MMA-BA-HEMA). Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS. ....	121
Figura 5.15. Cinética de conversão para os ensaios de encapsulamento <i>in situ</i> de 0,5% de RBL em copolímeros por polimerização em miniemulsão. ....	123
Figura 5.16. Aglomeração e perda de estabilidade da reação de encapsulamento <i>in situ</i> com copolímero de MMA e AA, nomeado P(MMA-AA)10%_R. ....	124
Figura 5.17. Distribuições de tamanhos de partícula ao longo das 2 horas de reação em miniemulsão para os ensaios de encapsulamento <i>in situ</i> de 0,5% de RBL para os copolímeros: A- PMMA_R, B- P(MMA-AA)_R, C- P(MMA-BA)_R, D- P(MMA-BA-AA)_R e E- P(MMA-BA-HEMA)_R. ....	125

Figura 5.18. Espectros de <sup>1</sup> H-RMN obtidos para os copolímeros com fármaco encapsulado. A- Espectro completo. B- Zoom na região de análise de copolimerização. ....	128
Figura 5.19. Comparação entre as frações molares de MMA alimentadas no reator e a calculadas com base nos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para os copolímeros com fármaco encapsulado. ....	130
Figura 5.20. Micrografias eletrônicas de varredura de alguns copolímeros com fármaco encapsulado: A – PMMA_R, B – P(MMA-AA)_R, C- P(MMA-BA)_R e D- P(MMA-BA-AA)_R.....	131
Figura 5.21. Termogramas de DSC para os copolímeros sem (linha contínua) e com (linha tracejada) fármaco encapsulado: A – PMMA e PMMA_R, B – P(MMA-BA)40% e P(MMA-BA)_R, C- P(MMA-BA-AA) e P(MMA-AA)_R, D- P(MMA-BA-HEMA) e P(MMA-BA-HEMA)_R e D- P(MMA-AA)_R. ....	133
Figura 5.22. Comparação de espectros de FTIR para nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com lisina na região <i>fingerprint</i> entre 2000 cm <sup>-1</sup> e 650 cm <sup>-1</sup> . ....	137
Figura 5.23. Espectros de FTIR na região <i>fingerprint</i> para as nanopartículas de copolímero carreadoras de rivastigmina e funcionalizadas com A- BSA e B- insulina. ....	140
Figura 6.1. Esquema representativo das etapas decisórias realizadas durante levantamento bibliográfico para o desenvolvimento de um protocolo experimental para análise de liberação <i>in vitro</i> de RBL. ....	142
Figura 6.2. Esquema ilustrativo da hipótese sugerida neste trabalho: controle de liberação de fármaco por meio da modulação de Tg do material da nanopartícula. ....	144
Figura 6.3. Cinética de liberação obtida para os copolímeros nos ensaios de liberação <i>in vitro</i> conduzidos com nanopartículas em látex. Os resultados são apresentados na forma de média da triplicata experimental (esferas) com desvio padrão e linha de tendência. ....	145
Figura 6.4. Comparação entre eficiência de liberação (%) e liberação (%) após 24h de ensaio de liberação <i>in vitro</i> com conduzido com nanopartículas em látex.....	147
Figura 6.5. Comparação entre Tg (°C) e liberação (%) após 24h, e curva cinética do ensaio de liberação <i>in vitro</i> conduzido com nanopartículas em látex. A – Materiais com eficiência de encapsulamento fixa em 89%. B – Materiais com eficiência de encapsulamento fixa em 57%. ....	148

Figura 6.6. Cinética de liberação obtida para os copolímeros nos ensaios de liberação <i>in vitro</i> conduzidos com nanopartículas liofilizadas. Os resultados são apresentados na forma de média da triplicata experimental (esferas) com desvio padrão e linha de tendência. ....	149
Figura 6.7. Comparação entre propriedades dos materiais e liberação (%) após 24h de ensaio de liberação <i>in vitro</i> conduzido com nanopartículas liofilizadas. A- Comparação com a eficiência de encapsulamento dos materiais. B- Comparação com a Tg dos materiais. ....	150
Figura 6.8. Esquema ilustrativo do interior da membrana de diálise nos ensaios de liberação. Comparação entre o comportamento de nanopartículas em forma de látex, que apresenta fármaco já disperso no meio, e de nanopartículas liofilizadas. ....	151
Figura 6.9. Viabilidade celular de HPAEC após 24h de exposição em concentração crescente de A- PMMA, B- P(MMA-BA) e C- P(MMA-BA-AA). Dados apresentados na forma de média de replicatas experimentais com barras de desvio padrão. ....	158
Figura 6.10. Comparativo da viabilidade celular de HPAEC calculada para os nanomateriais poliméricos avaliados partindo de uma solução 250µg de nanopartícula/L. ....	159
Figura 7.1. Infográfico das propriedades das nanopartículas sintetizadas, destacando a superioridade da formulação P(MMA-BA-AA). À direita, o esquema ilustra a sua aplicação como nanocarreador funcionalizado utilizando o mecanismo transcitose mediada por receptor para passagem da nanopartícula pela barreira hematoencefálica visando a entrega no cérebro. ....	163
Figura Apêndice 1. Concentração aquosa de rivastigmina base livre em ensaio de solubilidade com adição de Span 80 e Tween 80 no meio. ....	190
Figura Apêndice 2. Comparação espectros 1H-RMN do copolímero P(MMA-BA-HEMA) com os espectros preditos de BA e HEMA. ....	191
Figura Apêndice 3. Espectros DSC gerados pelo equipamento indicando Tg acima de 100oC (A), duas Tg's (B) e Tg abaixo de 50oC (C) para P(MMA-BA)40%, e resultado inconclusivo para P(MMA-BA)_R (D). ....	193
Figura Apêndice 4. Cromatogramas obtidos para solução padrão do fármaco em meio tampão (A), alíquota ensaio controle de fármaco após 8h de ensaio (B) e alíquota P(MMA-BA)_R ensaio conduzido com látex após 24h (C).D. ....	193

Figura Apêndice 6. Curva de calibração de RBL em meio tampão PBS calculada utilizando técnica de HPLC.C .....	196
Figura Apêndice 6. Curva de calibração de RBL em meio tampão PBS calculada utilizando técnica de HPLC.....	197
Figura Apêndice 7. Comparativo de percentual de fármaco liberado após 24h de ensaio in vitro antes e após saturação do filtro de seringa para ensaios com nanopartícula em látex (A) e liofilizada (B). *desvio padrão associado à triplicata experimental.....	198

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Exemplos de direcionamento ativo de nanopartículas poliméricas para entrega de ativos ao cérebro. ....	25
Tabela 2.2. Principais modelos matemáticos e suas características para modelagem de perfis de liberação. ....	32
Tabela 2.3. Literatura relacionada à produção de nanopartículas de polímeros sintéticos carregadas com rivastigmina. ....	39
Tabela 3.1. Emulsões preparadas na etapa de <i>Escolha de Surfactante</i> . ....	51
Tabela 3.2. Formulações usadas para conduzir as reações de polimerização em miniemulsão. Apenas a composição e o tipo de surfactante foram variados. ....	56
Tabela 3.3. Composição do meio experimental para condução das reações de copolimerização e de encapsulamento <i>in situ</i> em miniemulsão. ....	58
Tabela 4.1. Características dos surfactantes comerciais escolhidos para avaliação de estabilidade de emulsão MMA em água. ....	70
Tabela 4.2. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta do látex produzido em miniemulsão usando mistura de surfactantes não iônicos, adaptado de MANGIA <i>et al</i> (2022). O resultado comparativo "PMMA_SDS puro" foi retirado de MANGIA <i>et al</i> (2021). ....	96
Tabela 5.1. Tamanhos médios, PDIs, potenciais zeta e eficiências de encapsulamento para os látexes produzidos nas reações de homopolimerização de MMA com encapsulamento <i>in situ</i> de RBL. ....	103
Tabela 5.2. Tamanhos médios, PDIs e potenciais zeta dos látexes produzidos nas reações de copolimerização com MMA. ....	112
Tabela 5.3. Massas molares numéricas médias ( $M_n$ ), massas molares ponderais médias ( $M_w$ ) e polidispersões ( $M_w/M_n$ ) dos polímeros finais dos ensaios de copolimerização em miniemulsão. ....	114
Tabela 5.4. Composições molares ( $F_i$ ) e mássicas ( $w_i$ ) dos copolímeros, de acordo com os cálculos realizados com base nos espectros de $^1\text{H-RMN}$ . Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS. ....	117
Tabela 5.5. Temperaturas de transição vítrea do PMMA e dos copolímeros contendo BA calculadas pela equação de Fox, regra de aditividade e obtida experimentalmente pelo termograma de DSC. ....	120

Tabela 5.6. Diâmetros médios de partícula, índices de polidispersão (PDI), potenciais zeta e eficiências de encapsulamento de RBL nas nanopartículas de copolímero sintetizadas por meio de encapsulamento <i>in situ</i> em miniemulsão. ....	126
Tabela 5.7. Composições molares ( $F_i$ ) e mássicas ( $w_i$ ) dos copolímeros com fármaco encapsulado, de acordo com os cálculos realizados com base nos espectros de $^1\text{H-RMN}$ . ....	129
Tabela 5.8. Temperaturas de transição vítrea dos copolímeros com fármaco encapsulado calculada pela equação de Fox, regra da aditividade e pelo termograma de DSC experimental. ....	132
Tabela 5.9. Eficiência de lisina adsorvida em nanopartículas sem RBL e utilizando método EDC. ....	135
Tabela 5.10. Eficiências de funcionalização, diâmetros médios e potenciais zeta das partículas após bioconjugação.....	139
Tabela 6.1. Levantamento das condições experimentais utilizadas por artigos científicos que estudaram ensaio de liberação <i>in vitro</i> de RBL encapsulada em nanopartículas.....	143
Tabela 6.2. Modelos matemáticos, equações, determinantes de qualidade, coeficientes e interpretação matemática e física dos modelos mais adequados aos dados experimentais.....	153
Tabela Apêndice 1. Valores de TSI e taxas de cremeação e clarificação obtidos no estudo de surfactantes.....	188
Tabela Apêndice 2. Valores de TSI, taxas de cremeação e clarificação e índice de clarificação obtidos no estudo de determinação de HLB. ....	189
Tabela Apêndice 3. Valores de $T_g$ obtidos na caracterização experimental por DSC para o homopolímero controle, os copolímeros contendo BA e formulações contendo fármaco encapsulado.....	194
Tabela Apêndice 4. Percentuais de liberação de RBL calculados antes e após a saturação de filtro de seringa, em 24h de ensaio. ....	198
Tabela Apêndice 5. Modelos matemáticos, coeficientes de ajuste, eficiência de dissolução aplicados para os ensaios de liberação <i>in vitro</i> de RBL. ....	200

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- %EE: eficiência de encapsulamento
- $\alpha 2M$ :  $\alpha 2$  macroglobulina
- $\mu_{cla}$ : taxa de migração de clarificação
- $\mu_{cre}$ : taxa de migração de cremação
- AA: ácido acrílico
- apoE: apolipoproteína E
- APP: proteína precursora amilóide
- BA: acrilato de butila
- BHE: barreira hematoencefálica
- BS: sinal de espalhamento de fundo (*backscattering*)
- BSA: albumina de soro bovino
- CC50: concentração crítica para morte de 50% de uma população teste
- CEH: célula endotelial humana derivada da artéria pulmonar
- COPPE: Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia
- CPP: peptídeo célula-penetrante
- CTAB: brometo de cetrimônio
- D: coeficiente de distribuição
- DA: doença de Alzheimer
- DSC: análise de calorimetria de varredura diferencial
- EDC: 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)carbodiimida
- EE: eficiência de encapsulamento
- EngePol: Laboratório de Engenharia de Polímeros
- EPR: efeito de permeabilidade e retenção

FA: fase aquosa

FB: Farmacopeia Brasileira

FDA: *Food and Drug Administration*

FO: fase orgânica

FTIR: espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GPC: cromatografia de permeação em gel

GSH: glutationa

HEMA: metacrilato de 2-hidroxietila

HLB: balanço hidrofílico-lipofílico (*hydrophilic lipophilic balance*)

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

IC: índice de clarificação

ISO: *International Organization for Standardization*

KPS: persulfato de potássio

LABEFIT: Laboratório de Engenharia de Fenômenos Interfaciais

LD50: dose letal para matar 50% de uma população teste

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MMA: metacrilato de metila

MPEG-PCL: poli[metoxi(etilenoglicol)]-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona)

OPA: orto-ftaldialdeído

P(AM-AMPS): poliacrilamida-co-(ácido acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico)

P(MMA-AA): poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)

PBCA: poli(butil-ciano-acrilato)

PBS: tampão fosfato salino

PEC : pectina de maçã

PEQ: Programa de Engenharia Química

PHEMA: poli(metacrilato de 2-hidróxi-etila)

PHM: poli(metacrilato de hidroxietilaspirtamida)

PLGA: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLU: pluronic®

PMA: poli(acrilato de metila)

PVA : poli(acetato de vinila)

RAPSODEE: Centre De Recherches d'Albi en Génie des Procédés des Solides  
Divisés, de l'Energie et de l'Environnement

RBL: rivastigmina base livre

RMN: espectroscopia de ressonância magnética nuclear

ROS: espécies reativas de oxigênio

RVG: glicoproteína do vírus da raiva

SDS: dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio

SPAN80: monooleato de sorbitan 80

TAT: trans-ativador de transcrição

Tg: temperatura de transição vítrea

TGA: análise termogravimétrica

THF: tetrahidrofurano

TR: tartarato de rivastigmina

TSI: índice de estabilidade do Turbiscan (*Turbiscan stability index*)

TWEEN80 : polissorbatato 80

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

USP: *United States Pharmacopeia*

# Capítulo 1. Introdução

## 1.1 Contextualização

O tratamento da Doença de Alzheimer requer uma entrega eficiente de fármacos ao cérebro, entretanto, devido a sua importância no funcionamento do organismo e a existência de barreiras fisiológicas protetoras, o transporte de fármacos torna-se um inquestionável desafio, demandando a exploração de estratégias mais inovadoras como o uso de nanocarreadores. As vantagens do uso de nanomateriais especialmente no campo de prevenção e tratamento de doenças são vastas, incluindo desde melhorias físico-químicas (como aumento de biodisponibilidade e estabilidade *in vivo*) até a possibilidade de entrega específica de ativos terapêuticos (NIKEZIC *et al.*, 2020; PATRA *et al.*, 2018). Este último tipo de aplicação é de extremo interesse, particularmente para o tratamento de doenças cujo local de ação impõe dificuldades para o acesso, como é o caso do cérebro. Para entrega de fármacos ao cérebro, deve-se ultrapassar a barreira hematoencefálica, uma barreira fisiológica natural que é considerada o principal desafio para o tratamento de doenças cerebrais (BARNABAS, 2019; BILAL *et al.*, 2020; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; GUARNIERI *et al.*, 2013). Entre as principais doenças que acometem o cérebro e o sistema nervoso central como um todo, destacam-se as doenças neurodegenerativas.

A neurodegeneração é definida como o deterioramento estrutural ou funcional dos neurônios, causando perda das funções motoras e cognitivas, impactando significativamente o estilo de vida das pessoas acometidas (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2018). A doença de Alzheimer apresenta grande relevância nesse cenário, pois contabiliza cerca de 70% dos casos de síndromes cerebrais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Dados recentes estimam que 5,8 milhões de norte-americanos convivem com essa doença, que ainda apresenta uma alarmante tendência de aumento de número de casos, com previsões chegando a 7 milhões de norte-americanos em 2050 (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019; HEBERT *et al.*, 2013). Este número expressivo indica a necessidade da procura por tratamentos eficientes.

Atualmente, os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento da doença de Alzheimer atuam diretamente no cérebro, cuja presença da barreira hematoencefálica constitui um verdadeiro obstáculo, reduzindo a eficiência dos tratamentos de várias doenças do sistema nervoso central (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019; BARNABAS, 2019). Por isso, nanopartículas carreadoras de

fármaco para liberação controlada no cérebro constituem uma estratégia não invasiva bastante explorada na literatura. Entre as vantagens dessa técnica, podem ser ressaltadas a passagem direta pelas várias barreiras biológicas, devido ao tamanho reduzido das partículas, e a possibilidade de modulação de desempenho, por meio do uso de ligantes superficiais para aumento de tempo de circulação e direcionamento específico (ARYA *et al.*, 2019; BARNABAS, 2019).

Assim sendo, o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para entrega de medicamentos no cérebro pode ser considerado urgente. Nesse contexto, o presente trabalho pretendeu estudar a produção e o emprego de nanopartículas poliméricas biocompatíveis, com habilidades de modificação superficial por meio de funcionalização específica, para uso como agentes carreadores de rivastigmina, fármaco aprovado para o tratamento da doença de Alzheimer. As nanopartículas produzidas podem ser capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, transportando o fármaco para região alvo e exibindo liberação controlada, possibilitando um tratamento mais eficaz da doença de Alzheimer.

## **1.2 Os grupos de pesquisa**

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) e Laboratório de Engenharia de Fenômenos Interficiais (LABEFIT), ambos associados ao Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil, e no Centre De Recherches d'Albi en Génie des Procédés des Solides Divisés, de l'Energie et de l'Environnement (RAPSODEE) localizado na École des Mines d'Albi-Carmaux, França. Para os ensaios *in vitro* com culturas celulares, os ensaios foram realizados em colaboração com o Centre de Recherche Cardio Thoracique de Bordeaux na Université de Bordeaux. Os grupos de pesquisas em que se insere o presente trabalho apresentam grande experiência e capacidade na grande área de conhecimento da tese, comprovada pela publicação de vários manuscritos nos campos de encapsulamento de ativos em matrizes poliméricas e de funcionalização de suportes, como descrito nos próximos parágrafos.

Estudos acerca da síntese de nanossistemas para aplicações biomédicas indicou a superioridade dos materiais poliméricos frente aos lipossomas como nanocarreadores,

devido a sua elevada estabilidade e alta eficiência de encapsulamento (PAIVA *et al.*, 2016). Especificamente no campo de tratamento de doenças, diversos ativos como fármacos, antibióticos e quimioterápicos foram satisfatoriamente encapsulados em matrizes poliméricas visando melhorias dos tratamentos convencionais, como no caso da esquistossomose e do câncer, a partir da liberação inteligente e modulada por pH e síntese de agentes embolizantes, respectivamente (ALVES *et al.*, 2021, FONSECA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2011, 2012b, a). A incorporação de outras propriedades pelos nanocarreadores também foi investigada a partir da funcionalização de nanopartículas. A análise e consolidação de protocolos experimentais para funcionalização já foi avaliada previamente e a sua realização traz impactos diversos, incluindo a modificação do comportamento de captura das nanopartículas por macrófagos (CAMPOS *et al.*, 2019; WAY *et al.*, 2019). Estes estudos, portanto, exemplificam a notável versatilidade de aplicações das nanopartículas poliméricas e o estabelecimento de protocolos de síntese, funcionalização e encapsulamento de ativos visando à aplicações biomédicas.

Particularmente para o desenvolvimento desta tese, destacam-se o trabalho de Campos *et al.* (2016) e de Mangia *et al.* (2021). O primeiro atuou no desenvolvimento de nanopartículas de poli(metacrilato de metila - co - ácido acrílico) (P(MMA-AA)) e compararam mecanismos de funcionalização diferentes com o peptídeo lisina e a proteína albumina de soro bovino (CAMPOS *et al.*, 2016). Mangia *et al.* (2021) investigou a imobilização química de peptídeo de internalização celular em nanopartículas de P(MMA-AA) carreadoras de rivastigmina (MANGIA *et al.*, 2021).

O conhecimento técnico-científico explorado pelos grupos de pesquisa, especialmente nas áreas de reação de polimerização via miniemulsão e de protocolos de funcionalização química, contribuíram significativamente para o desenvolvimento do presente trabalho.

### 1.3 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver um nanossistema biocompatível para entrega controlada de fármacos a partir do encapsulamento de rivastigmina base livre em nanopartículas de copolímeros modelo com capacidade de funcionalização, visando ao transporte sítio-dirigido através da barreira hematoencefálica.

#### 1.3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- estudar e avaliar o desempenho de diferentes surfactantes comerciais na estabilização de emulsões precursoras da reação de polimerização, utilizando o monômero modelo metacrilato de metila (MMA), visando à escolha do surfactante mais eficiente entre os analisados;
- determinar a concentração ideal do surfactante escolhido, usando MMA nas condições da emulsão precursora da polimerização;
- estudar o comportamento da polimerização em miniemulsão do MMA, utilizando as melhores condições de emulsificação determinadas previamente, visando à obtenção de diâmetros de partícula médios na faixa de 20-100 nm;
- avaliar o uso da metodologia de polimerização em miniemulsão para a introdução de funcionalidades diferentes por meio de reações de copolimerização;
- estudar a eficiência da ancoragem física e química de biomoléculas modelo;
- utilizar a metodologia de encapsulamento *in situ* de rivastigmina base livre para síntese de nanopartículas carreadoras de fármaco;
- desenvolver um protocolo experimental e avaliar o perfil de liberação da rivastigmina base livre encapsulada *in vitro*;
- verificar o comportamento dos nanossistemas desenvolvidos em ensaios *in vitro* por meio da avaliação de segurança, utilizando modelo de célula humana.

#### **1.4 Estrutura da tese**

Este documento está organizado em 8 capítulos e 10 apêndices. No Capítulo 1 foi apresentada uma breve introdução do tema, assim como os objetivos gerais e específicos almejados nesse estudo.

O Capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura utilizada, para contextualização e justificativa do desenvolvimento da tese.

O Capítulo 3 descreve os materiais e as metodologias aplicadas no decorrer dos ensaios experimentais executados.

Nos Capítulos 4, 5 e 6 são apresentados e discutidos os resultados obtidos. O Capítulo 7 apresenta as principais conclusões dos estudos realizados, ressaltando as suas contribuições originais e indicando sugestões para futuros desenvolvimentos.

No Capítulo 8 encontra-se a lista das referências bibliográficas consultadas ao longo do documento. Finalmente, apresentam-se apêndices com informações adicionais usadas para a discussão dos resultados encontrados.

## Capítulo 2. Revisão Teórica e Bibliográfica

### 2.1 Nanomateriais e vantagens de uso na área médica

A investigação de materiais em escala nanométrica possibilitou a descoberta de propriedades diferenciadas que podem ser exploradas de forma atrativa em várias áreas do conhecimento. A definição de nanomaterial é controversa e ainda está em constante debate (SOARES *et al.*, 2018). Enquanto que a *International Organization for Standardization* (ISO) os definem como materiais com qualquer dimensão (interna ou externa) na nanoescala (de 1 a 100 nm), discussões científicas visando o reconhecimento consensual das propriedades físico-químicas diferenciadas e relacionadas à nanoescala (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2013). O rearranjo molecular necessário para alcançar essa diminuta escala confere elevadas área de contato e energia livre de superfície e redução de imperfeições, as quais modificam significativamente os princípios de comportamento de um material, originando características únicas (SU *et al.*, 2018). Entre essas, destacam-se propriedades magnéticas, como efeitos superparamagnéticos; térmicas, como alteração de temperaturas de fusão; químicas, como aumento de reatividade; óticas, como em mudança do espalhamento de luz por um material, entre outras (SU *et al.*, 2018). Isso faz com que os nanomateriais suscitem grande interesse comercial e atrativa utilidade em diversos setores, que vão desde vestuário e cuidado pessoal até indústrias aeroespaciais, biorremediação e meio ambiente (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2013). Entre estes setores, podemos destacar a impressionante quantidade de aplicações dos nanomateriais na área médica.

A nanomedicina explora o uso das singularidades de propriedades dos materiais em escala nanométrica para o aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (CHOLKAR *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2010; PATRA *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018). Há ainda uma quarta área de crescente interesse que combina o diagnóstico e a terapia, chamada de teranóstica (CHOLKAR *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2018). Uma grande vantagem do uso de nanomateriais na área médica é a possibilidade de interação com biomoléculas, membranas celulares e organelas graças à similaridade de dimensão e elevada superfície de contato (CHOLKAR *et al.*, 2017; PATRA *et al.*, 2018). Isso permite que os nanomateriais possam superar importantes desafios na área,

contribuindo com o melhoramento de dispositivos para diagnóstico precoce e tratamento de doenças com alta especificidade e personalização para melhoria de qualidade de vida do paciente (CHOLKAR; HIRANI; NATARAJAN, 2017; PELAZ *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2018).

Nanomateriais têm sido principalmente explorados como veículos carreadores de fármacos, em especial de agentes anticancerígenos (CHOLKAR *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2010; NIKEZIĆ *et al.*, 2020). Isso se justifica pela possibilidade de direcionamento de forma ativa ou passiva do tratamento, viabilizando aumento de eficácia e redução de efeitos adversos (NIKEZIĆ *et al.*, 2020; PELAZ *et al.*, 2017). Há ainda o atrativo de estabilidade e proteção da carga terapêutica através de barreiras biológicas, não restringindo a aplicabilidade para o tratamento de câncer (PELAZ *et al.*, 2017). De fato, a possibilidade de entrega seletiva e direcionada, proporcionada pelos nanomateriais, pode ser utilizada para solucionar adversidades encontradas no tratamento de algumas doenças, em especial aquelas que acometem o sistema nervoso central (HUANG *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2018).

## **2.2 A doença de Alzheimer**

As doenças neurológicas são patologias que acometem o cérebro e demais componentes do sistema nervoso central e periférico, impactando intensivamente a qualidade de vida da pessoa acometida (KHAN *et al.*, 2018). Entre as mais frequentes, podemos destacar a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esquizofrenia, lesão cerebral traumática, acidente vascular cerebral, entre outras (KHAN *et al.*, 2018).

A doença de Alzheimer (DA) apresenta elevada notoriedade devido ao número expressivo de casos. A DA é relatada como a causa de 60-70% dos casos de demência, síndrome caracterizada por um declínio progressivo das funções cognitivas (SE THOE *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Um dos principais fatores de risco associados à DA é a idade, sendo que a incidência de casos aumenta expressivamente com a idade (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019; ZVĚŘOVÁ, 2019). De acordo com dados da *Alzheimer's Association* (2019), 3% dos americanos entre 65 e 74 anos possuem Alzheimer e essa porcentagem aumenta para 17% nos indivíduos com idade entre 75 e 84 anos, e para 32% nos indivíduos com idade acima de 85 anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019). Nos Estados Unidos, a DA representou a 6<sup>a</sup>

maior causa de morte e entre os anos 2000 e 2014, tendo sido observado um salto de 89% no número de mortes associadas ao mal de Alzheimer neste mesmo período. Esse número é ainda mais significativo quando comparado ao número de incidência de óbito por doença cardíaca, 1ª causa de morte nos Estados Unidos, que caiu 14% no mesmo período testado (2000 a 2014) (ALZHEIMERS ASSOCIATION; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).

Além do elevado número de casos atual, outro quesito relevante é a expectativa do aumento expressivo de futuros casos de DA. Com o aumento da expectativa de vida, espera-se também um aumento dos números de doenças associadas ao envelhecimento. De fato, estima-se que a cada três segundos uma pessoa desenvolva demência, e 130 milhões de pessoas com Alzheimer são esperadas em 2050 no mundo (ZVĚŘOVÁ, 2019). Em 2018, o custo mundial associado ao tratamento de demência foi de 1 trilhão de dólares americanos e uma estimativa prevê que este valor dobre em 2030 (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2018). Assim, o tratamento da DA, além de constituir uma demanda dos setores social e de saúde, surge também como um fator de impacto expressivo na economia mundial.

O tratamento da doença de Alzheimer está associado aos seus sintomas e suas características fisiológicas. A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva multifatorial, cuja deficiência na funcionalidade neural impacta severamente na perda das funções cognitivas, de memória, de linguagem, e na independência e realização de atividades cotidianas do indivíduo (SE THOE *et al.*, 2021; ZVĚŘOVÁ, 2019). Apesar da maior incidência de casos estar associada ao envelhecimento, a causa da doença ainda é incerta. Estudos na área ainda questionam se a doença de Alzheimer poderia estar relacionada a desdobramentos biológicos específicos de envelhecimento, ou se a patologia poderia ser resultado de tempo de incubação de agentes tóxicos. Como a causa permanece desconhecida, ainda não foi possível encontrar a cura para a doença de Alzheimer (HUANG ; MUCKE, 2012).

Atualmente, sabe-se que a patologia do Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo intra- e extracelular de dois conjuntos de proteínas principais. O primeiro deles inclui os peptídeos beta-amiloides, que são constituintes naturais do cérebro e integrantes das placas amiloides. Entretanto, o acúmulo dessas placas sólidas nos neurônios ocasiona a degradação da comunicação neural, gerando a perda funcional da célula nervosa (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2018; BACHURIN *et al.*, 2017;

EFTEKHARZADEH *et al.*, 2016; HUANG ; MUCKE, 2012). Além do acúmulo anormal de placas amiloides, a DA também pode ser caracterizada pela conformação disfuncional da proteína tau. Em organismos não saudáveis, essa proteína se apresenta na forma de emaranhados neurofibrilares em altas concentrações, que bloqueiam o sistema de transporte dos neurônios, impactando a funcionalidade e causando morte celular (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2018; EFTEKHARZADEH *et al.*, 2016; HOLTZMAN *et al.*, 2016; HUANG ; MUCKE, 2012). Por conta disso, as tendências na área de novos tratamento para a doença de Alzheimer estão voltadas principalmente para a modulação da doença a partir da regulação dessas proteínas (BACHURIN *et al.*, 2017; PARDO-MORENO *et al.*, 2022). Para tanto, fármacos para o controle de agregação de peptídeos beta-amiloides e de proteínas tau, vacinas com agentes anti-amiloides, e alternativas mais inovadoras que incluem o uso de células-tronco e terapia gênica estão sendo estudadas (BACHURIN *et al.*, 2017; SE THOE *et al.*, 2021; SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Entretanto, os resultados não são ainda promissores. Até o momento, vários ensaios clínicos, mesmo em Fase 3, foram interrompidos por levarem a resultados inconsistentes e a muitos efeitos adversos (BACHURIN *et al.*, 2017; SE THOE *et al.*, 2021; SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Acredita-se que a justificativa para essa elevada taxa de falha esteja relacionada ao desconhecimento das funções metabólicas e na elevada complexidade multifatorial, não totalmente compreendida, da progressão da doença de Alzheimer (SE THOE *et al.*, 2021). Por isso, os medicamentos aprovados para tratamento da doença de Alzheimer atuam apenas de forma sintomática e não são capazes de evitar a progressão da doença (ANAND *et al.*, 2014; BACHURIN *et al.*, 2017).

O tratamento padrão da doença de Alzheimer é realizado por meio de inibidores da enzima acetilcolinesterase, que atuam no equilíbrio deste neurotransmissor, melhorando as funções cognitivas e amplificando a ativação dos seus receptores, o que contribui para a atenuação dos sintomas. Entre esses inibidores, podem ser citados o donepezil, a galantamina e o tartarato rivastigmina (Figura 2.1) (PARDO-MORENO *et al.*, 2022; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013). Adicionalmente, pode ser citada ainda a memantina, que também atua no cérebro, mas como um composto químico competidor de um receptor neural, reduzindo efeitos neurotóxicos (BACHURIN *et al.*, 2017). Em especial, destaca-se o desempenho notório da rivastigmina frente aos outros inibidores, pois ela apresenta uma regiosseletividade maior, permitindo a atuação sobre diferentes tipos de acetilcolinesterase somente na região cerebral e reduzindo efeitos

tóxicos periféricos (ANNICCHIARICO *et al.*, 2007; BACHURIN *et al.*, 2017; MULLER, 2007). Entretanto, o uso desses medicamentos é muito associado à ocorrência de efeitos adversos, que dificultam a aceitação ao tratamento (PARDO-MORENO *et al.*, 2022; SE THOE *et al.*, 2021). Por isso, existe ainda uma forte demanda por estratégias terapêuticas que sejam mais eficientes e específicas para as regiões mais afetadas do cérebro.

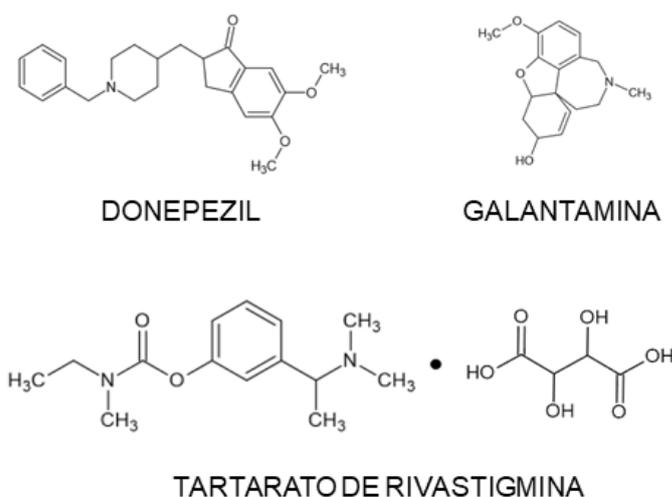


Figura 2.1. Fórmulas químicas dos inibidores enzimáticos atualmente utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer.

### 2.3 Nanomateriais para entrega de fármacos ao cérebro

Um fundamento central para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença de Alzheimer é o transporte eficiente de medicamentos para o cérebro (ARYA *et al.*, 2019; BARNABAS, 2019). Este importante órgão é protegido por uma barreira fisiológica, a barreira hematoencefálica (BHE), que é responsável por controlar a entrada de nutrientes e substâncias e preservar o cérebro da ação de agentes patogênicos e neurotóxicos (KHAN *et al.*, 2018; SE THOE *et al.*, 2021; SONG *et al.*, 2018). Por conta da elevada especificidade e seletividade, atravessar a BHE pode ser considerado como um grande desafio, explicando a alta taxa de fracassos na entrega de medicamentos ao cérebro (ARYA *et al.*, 2019; BARNABAS, 2019; BILAL *et al.*, 2020). Por isso, compreender a estrutura e as funções da BHE é indispensável para estabelecer o transporte de moléculas para o cérebro.

Para cumprir a sua função regulatória, a BHE apresenta não só diferentes mecanismos de transporte para controlar a entrada/saída de substâncias, como também uma composição estrutural complexa, como ilustrado na Figura 2.2. Os astrócitos garantem o suporte estrutural do principal componente da BHE: as células endoteliais, que são unidas por junções aderentes e ocludentes (*tight*) extremamente firmes, que são essenciais para a proteção do cérebro (KHAN *et al.*, 2018). O transporte de moléculas maiores e essenciais, como glicose e aminoácidos, é conduzido por meio de proteínas transmembranares. A endocitose mediada por receptores específicos permite a entrada de hormônios (insulina), enzimas e proteínas (transferrina). Já o mecanismo mediado por adsorção controla a entrada de algumas proteínas por meio de interação eletrostática. Há ainda o transporte passivo transcelular, que permite a entrada de compostos lipofílicos e de baixa massa molar, enquanto o transporte paracelular responde pela passagem de moléculas entre as células. Por fim, um sistema de transporte ativo de influxo e efluxo, coordena a entrada de substâncias contra o gradiente de concentração e protege a entrada de potenciais toxinas. A realização correta destes mecanismos é imprescindível para manter o equilíbrio químico e o funcionamento neural adequado, o que acaba impedindo a entrada de moléculas maiores, como os fármacos, reduzindo a sua capacidade terapêutica (ARYA *et al.*, 2019; BARNABAS, 2019; KHAN *et al.*, 2018).

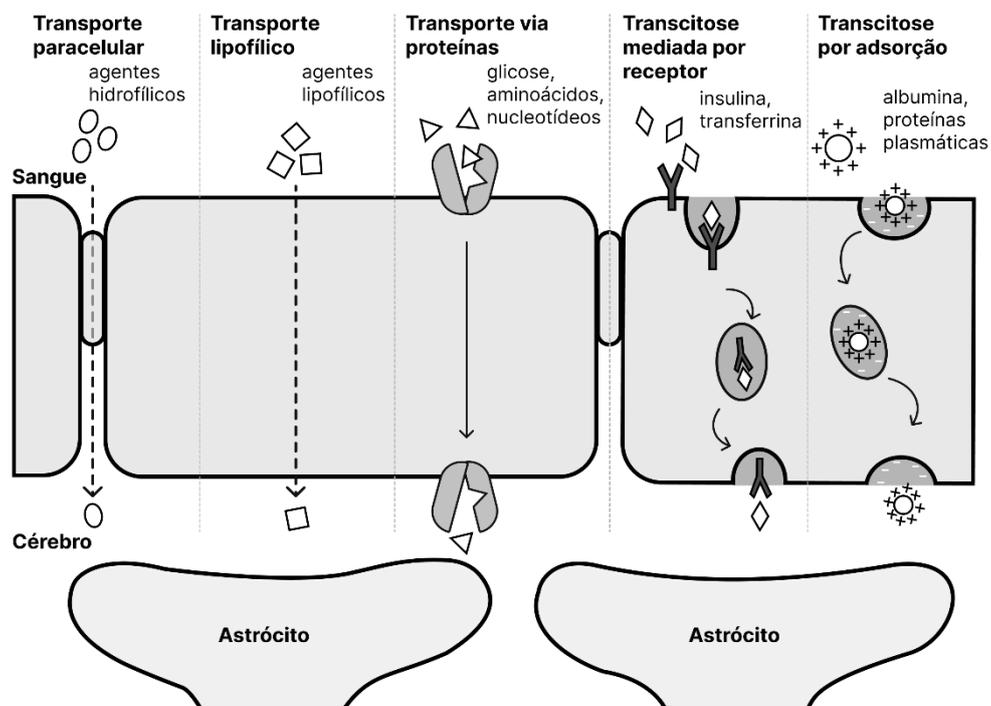


Figura 2.2. Representação esquemática dos diferentes transportes na barreira hematoencefálica. Adaptado de ARYA *et al.* (2019).

Existem duas abordagens básicas para a entrega de fármacos no cérebro: os (i) métodos invasivos; ou os (ii) métodos não invasivos. As estratégias invasivas se baseiam na abertura momentânea da BHE (por meio do uso de solventes, ultrassom e agentes de vasodilatação), injeção/infusão direta ou uso de implantes. Entretanto, o uso dessas metodologias está profundamente associado ao risco de entrada de neurotoxinas, aparecimento de efeitos adversos e danos ao tecido cerebral (BARNABAS, 2019). Essas desvantagens significativas impulsionam uma maior investigação de métodos não invasivos.

As metodologias não invasivas podem apresentar diferentes enfoques. Algumas se baseiam na modificação química do medicamento, como o aumento de lipossolubilidade e a incorporação de substâncias endógenas, mas essa alteração pode impactar o mecanismo de ação do fármaco (BARNABAS, 2019). Outra estratégia amplamente divulgada inclui o uso das singularidades da nanoescala para potencializar a entrega de fármacos através da BHE, o que pode ser atingido por meio do transporte de fármacos em nanocarreadores (ARYA *et al.*, 2019; BARNABAS, 2019; DONG, 2018; NIU *et al.*, 2019).

O uso de nanocarreadores apresenta vários benefícios em relação às terapias convencionais, possibilitando superar as principais desvantagens da liberação de fármacos no cérebro (ARYA *et al.*, 2019; BILAL *et al.*, 2020). Algumas propriedades físico-químicas dos fármacos que podem ser melhoradas são: incremento de tempo de meia vida, aumento de biodisponibilidade, redução de efeitos adversos, liberação controlada e direcionamento de entrega específica, viabilizando um melhor resultado terapêutico (ARYA *et al.*, 2019; BILAL *et al.*, 2020). Além disso, o tamanho reduzido favorece a passagem através de várias barreiras biológicas, como a BHE, e algumas alterações nas propriedades das nanopartículas podem modular o desempenho do nanocarreador (BARNABAS, 2019). Entre estas, destaca-se a inserção de ligantes de direcionamento específico, que aumenta o potencial de direcionamento e especificidade, e de ligantes de blindagem, visando a ampliar o tempo de circulação do nanocarreador (BARNABAS, 2019). Por isso, a literatura evidencia o uso de nanopartículas como uma das melhores abordagens para redução de casos de morte associados à doença de Alzheimer (ARYA *et al.*, 2019).

As nanopartículas mais comumente exploradas para o tratamento dessa doença são: nanopartículas inorgânicas, nanotubos de carbono, nanopartículas poliméricas,

lipossomas, nanopartículas lipídico-sólidas, microemulsões, micelas, dendrímeros e hidrogéis (ARYA *et al.*, 2019; BILAL *et al.*, 2020; NIU *et al.*, 2019). Os materiais poliméricos apresentam destaque no campo de desenvolvimento de estratégias para entrega de medicamentos, devido ao grande potencial para modificação da estrutura química, bom controle farmacocinético e por serem materiais oportunos para encapsulamento e liberação controlada de fármacos (VENDITTI, 2019). Por isso, nanopartículas poliméricas são consideradas nanocarreadores excelentes para transporte de medicamentos para o sistema nervoso central (ARYA *et al.*, 2019).

As nanopartículas poliméricas podem ser constituídas por polímeros sintéticos ou naturais, apresentando superfícies hidrofílicas ou hidrofóbicas e frequentemente boa biocompatibilidade. O modo de administração das nanopartículas poliméricas é muito variado, podendo ser oral, sub-cutâneo, intranasal ou intravenoso, sendo essa uma importante vantagem para formulações farmacêuticas. A versatilidade também é conferida pelo mecanismo de transporte através da BHE, que pode ocorrer por transcitose ou endocitose mediada por receptores. Esta última pode ser aprimorada por meio da incorporação de ligantes direcionadores ou peptídeos internalizados por células (“*cell-penetrating peptides*” – CPP) nas superfícies das nanopartículas (ARYA *et al.*, 2019; EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

Dessa forma, o uso de nanopartículas poliméricas constitui uma estratégia muito promissora para carreamento de fármacos através do principal obstáculo fisiológico, a barreira hematoencefálica. Em particular, a versatilidade de composição e a possibilidade de modificação estrutural constituem grandes vantagens de interesse na área de direcionamento de fármacos para o cérebro.

## 2.4 Nanopartículas poliméricas

### 2.4.1 Tipos de nanocarreadores

Os nanocarreadores poliméricos podem apresentar diferentes estruturas, como ilustrado na Figura 2.3.

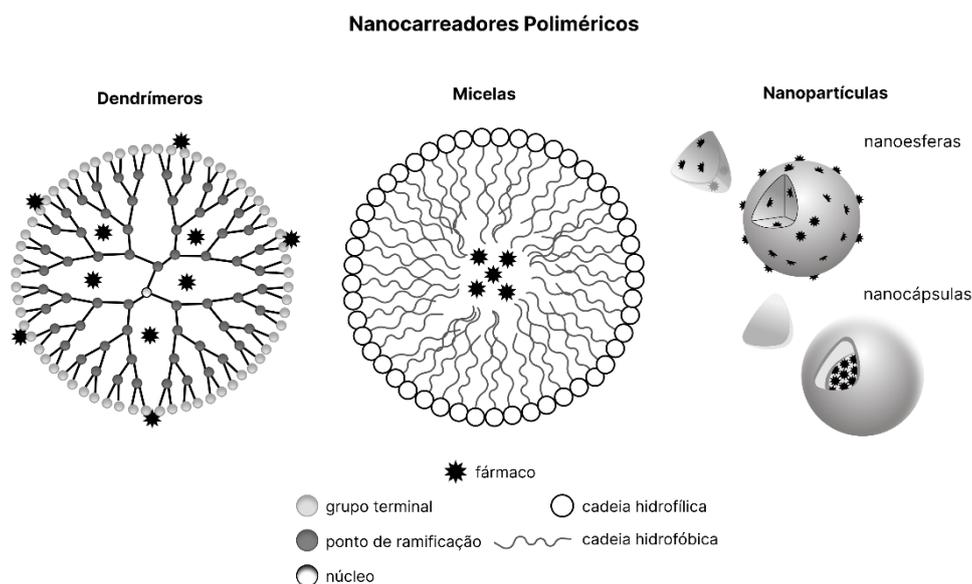


Figura 2.3. Estruturas de diferentes nanocarreadores poliméricos. Adaptado de VENDITTI (2019) e EL-SAY e EL-SAWY (2017).

Os dendrímeros são arcabouços orgânicos ramificados com um núcleo interno. Os fármacos podem ser incorporados tanto por meio de ligações covalentes quanto por forças eletrostáticas. Entre as vantagens associadas ao uso desses materiais, podem ser citados o aumento de meia-vida, estabilidade e solubilidade do ativo encapsulado, a boa permeabilidade em barreiras biológicas e a alta capacidade de direcionamento. Entretanto, essas estruturas apresentam baixa capacidade de liberação de fármaco e dendrímeros catiônicos apresentam respostas tóxicas, o que afeta a biocompatibilidade do nanossistema. Além disso, há ainda a dificuldade de produção em grande quantidade e elevado grau de pureza no momento, o que pode limitar a aplicação como carreador de fármaco de importância industrial (VENDITTI, 2019).

As micelas poliméricas são estruturas do tipo casca-núcleo ou vesiculares formadas por moléculas poliméricas anfifílicas dispersas em meio aquoso (KHAN *et al.*, 2018). Fármacos hidrofóbicos podem ser encapsulados no núcleo da micela, enquanto a

sua natureza hidrofílica da superfície é capaz de aumentar o tempo de circulação no organismo. No entanto, o uso de micelas poliméricas pode apresentar desvantagens significativas, como a reduzida estabilidade, a baixa capacidade de direcionamento e a baixa eficiência de encapsulamento, o que pode ocasionar a liberação precoce do fármaco encapsulado (VENDITTI, 2019). Por isso, os principais estudos na área estão direcionados para o uso de agentes reticulantes (*cross-linking*) ou ligações biodegradáveis, a fim de melhorar a estabilidade das micelas sem a perda da capacidade de liberação controlada (NOGUEIRA *et al.*, 2019; SANG *et al.*, 2018; VENDITTI, 2019).

Por fim, as nanopartículas poliméricas são estruturas tridimensionais caracterizadas por tamanhos na faixa entre 10 e 1000 nm, que podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas (RAO; GECKELER, 2011; VENDITTI, 2019). As nanocápsulas apresentam uma estrutura vesicular capaz de conter o fármaco no interior fluido (aquoso ou não), o qual é recoberto por uma camada polimérica (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; RAO; GECKELER, 2011). Esta conformação também permite o direcionamento específico, liberação controlada e melhora de biodisponibilidade e estabilidade dos fármacos. A seleção dos materiais constitui uma etapa essencial do desenvolvimento desses sistemas, a fim de garantir a estabilidade, capacidade de encapsulamento e biocompatibilidade do nanocarreador (VENDITTI, 2019).

Por sua vez, as nanoesferas são matrizes sólidas que permitem grande versatilidade de metodologias para incorporação de fármacos, como a dissolução, a precipitação e a adsorção (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; VENDITTI, 2019). As nanoesferas apresentam alto potencial para permeação celular, capacidade para liberação controlada por longos períodos e são comumente associadas a modificadores de superfície para aumentar a biodistribuição e a eficiência de direcionamento específico. Outra vantagem viável é a possível formação de nanogéis, caracterizados pela presença de uma rede polimérica hidrofílica reticulada, o que permite o melhoramento de algumas propriedades de interesse, como a biocompatibilidade e a flexibilidade. Algumas aplicações promissoras das nanopartículas são o direcionamento de fármacos para tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, o aumento da permeabilidade dos medicamento através da pele por aplicação tópica e o uso de nanopartículas sensíveis ao pH, para melhorar a biodisponibilidade de fármacos em administrações orais (VENDITTI, 2019).

Além das vantagens previamente mencionadas, suspensões de nanopartículas poliméricas apresentam elevada estabilidade, permitindo aumentar a atividade de ativos voláteis e acelerar a taxa de adsorção de fármacos, justificada por meio da grande interface entre o nanomaterial e o alvo biológico em solução. Por isso, nanopartículas poliméricas são consideradas carreadores ideais em diferentes campos de aplicação, como na produção de vacinas, na engenharia de tecidos, no desenvolvimento de terapias contra o câncer e na liberação de antibióticos (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

Um fator crucial para que a nanopartícula possa atuar como um carreador sítio-dirigido de fármacos eficiente é o comportamento adequado na circulação sanguínea. Após administração intravenosa, as nanopartículas tendem a ser eliminadas do sangue pelo sistema de retículo endotelial e principalmente pelo fígado e rins (WESTMEIER *et al.*, 2016). Pouco se sabe sobre a distribuição de nanopartículas no organismo (WESTMEIER *et al.*, 2016), mas acredita-se que as propriedades das nanopartículas podem influenciar o desempenho biológico, incluindo o diâmetro médio da partícula e a capacidade de agregação (WEI *et al.*, 2018).

Ainda há um debate muito extenso acerca das dimensões adequadas para liberação controlada em um local específico. Entretanto, é indicado que nanopartículas de diâmetros muito pequenos (menores que 6 nm) podem ser rapidamente eliminadas do organismo. Por isso, nanopartículas maiores podem aumentar o tempo de circulação, o que pode melhorar a eficácia da entrega, mas também pode aumentar as taxas de internalização não específica (KANG *et al.*, 2019). Sabe-se que o tamanho de partículas para distribuição na corrente sanguínea deve ser significativamente menor que 5  $\mu\text{m}$  (diâmetro dos menores capilares do corpo) e sem tendência à formação de agregados, para evitar a embolização (SINGH *et al.*, 2009). Partículas menores que 200 nm resultam em internalização celular muito mais facilitada do que aquelas com tamanhos micrométricos (GEHR, 2018). ELSABAHY E WOOLEY (2012) destacaram que nanopartículas com tamanho intermediário (20-100 nm) apresentam o maior potencial para aplicações *in vivo* devido à circulação por longos períodos e capacidade para evitar as captações renal e linfática, além da fagocitose mediada por mecanismos de defesa (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Ainda assim, apesar de constituir um parâmetro de elevada importância para a distribuição na circulação sanguínea, o diâmetro da nanopartícula não pode ser considerado como um fator isolado (KANG *et al.*, 2019). A

elevada superfície específica das nanopartículas favorece a interação com biomoléculas presentes no meio, que podem também afetar o comportamento na corrente sanguínea.

As biomoléculas podem também se adsorver na superfície das nanopartículas, formando uma coroa de proteínas/biomoléculas. Esta coroa pode desencadear respostas imunes, afetar a toxicidade e modificar a capacidade de direcionamento do nanomaterial. Modular a composição da coroa pode ser atrativo para aumentar a captação celular de nanocarreadores, auxiliar o transporte através de barreiras biológicas, como a BHE, e reduzir a toxicidade. Uma estratégia comumente apresentada para aumentar tempo de circulação de nanomateriais e prevenir a captação não específica é utilizar enxertos poliméricos hidrofílicos superficiais para criar uma barreira de repulsão estérica à formação da coroa proteica nos nanocarreadores (WESTMEIER *et al.*, 2016). Dessa forma, consegue-se não só reduzir a toxicidade do nanomaterial, mas também desenvolver um nanomaterial mais adequado para liberação de fármacos específicos.

Tendo em vista o exposto, as nanopartículas se destacam entre os nanocarreadores poliméricos por apresentarem características atrativas para o encapsulamento de fármacos, como o elevado potencial para liberação controlada e sítio-específica. Apesar da cinética de eliminação e distribuição de nanopartículas na circulação sanguínea não ser totalmente elucidada, sabe-se que o diâmetro de partícula e a composição superficial podem alterar a capacidade de liberar o fármaco no local de ação pretendido. Esses desafios podem ser abordados no momento de síntese dos nanocarreadores, a partir da escolha do polímero mais adequado e do controle operacional das condições de síntese.

#### 2.4.2 Síntese de nanopartículas

Sabe-se que a escolha do polímero e a capacidade de liberação do fármaco impacta muito a aplicação final do nanocarreador (EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Entretanto, não existe uma conclusão absoluta sobre a especificação de materiais para determinada aplicação. Por isso, a escolha do polímero é dependente das características desejáveis da nanopartícula (EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Para uso em aplicações médicas, os polímeros não precisam ser necessariamente biodegradáveis, mas devem apresentar as propriedades químicas e mecânicas de interesse (PARK, 2014; TIAN *et al.*, 2012). De acordo com a origem, esses polímeros podem ser classificados como naturais ou sintéticos.

Entre os materiais naturais mais usados para síntese de nanopartículas, citam-se o alginato de sódio, a quitosana e a gelatina (EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Entretanto, o uso de polímeros sintéticos vem ganhando elevada notoriedade devido à alta versatilidade de propriedades químicas e físicas que podem ser ajustadas durante a síntese, seja por meio da polimerização ou copolimerização (TIAN *et al.*, 2012). Entre os materiais sintéticos, destacam-se os polilactídeos, como o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido lácteo-co-ácido glicólico) (PLGA), o poli(cianoacrilato), a policaprolactana, o polianidrido, a poliacrilamida, o polietilenoglicol (PEG), o poli(ácido acrílico) (PAA), o poli(álcool vinílico) (PVA), o poli(metacrilato de metila) (PMMA), entre outros (BARNABAS, 2019; EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Para a síntese de nanopartículas, existem variadas técnicas possíveis, sendo que a escolha do método mais adequado impacta as propriedades da nanopartícula.

As metodologias normalmente empregadas para a síntese de nanopartículas podem ser divididas em dois grandes grupos: (i) síntese a partir de polímero pré-formados e (ii) síntese a partir da polimerização direta do monômero. Para o primeiro grupo, citam-se as técnicas de evaporação de solvente, *salting-out*, nanoprecipitação, uso de tecnologia de fluido supercrítico e diálise. Entre essas, a evaporação de solvente é uma das mais exploradas na literatura. Ela é caracterizada pela preparação inicial de uma solução de polímero pré-formado disperso em solvente volátil que é convertida lentamente em nanopartículas a partir da evaporação do solvente e precipitação do material polimérico, que pode ser recuperado por ultracentrifugação. Comumente, os solventes utilizados são o clorofórmio ou o diclorometano, o que é bastante controverso por conta de questões toxicológicas e de segurança (CRUCHO; BARROS, 2017; EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Por isso, uma grande tendência é a substituição desses solventes por outros mais ambientalmente corretos e biocompatíveis, como acetato de etila e acetona.

Já a síntese de nanopartículas a partir de reações de polimerização viabiliza diferentes técnicas de preparo, como as reações em emulsão, em miniemulsão, em microemulsão, sem surfactante e interfacial (CRUCHO; BARROS, 2017; EL-SAY; EL-SAWY, 2017). Entre essas, a polimerização em emulsão apresenta grande destaque na literatura, já que a principal vantagem dessa técnica está associada ao uso de água como meio dispersante. Esse fato apresenta benefícios não só do ponto de vista operacional, devido à facilidade de controle, mas também quanto à aplicabilidade do nanossistema, já que é utilizado um solvente não tóxico. A depender da quantidade de surfactante e de

outros componentes usados, podem ser definidas diferentes estratégias de polimerização em emulsão (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; GHARIEH *et al.*, 2019).

A polimerização parte de uma emulsão inicial, em que um líquido é disperso na forma de gotas em um segundo líquido, em que a imiscibilidade é parcial ou total, com o auxílio de surfactantes. Essas moléculas anfifílicas promovem a estabilidade da mistura por meio da redução da tensão interfacial entre os dois líquidos. Dependendo do tamanho de gota formado, a emulsão pode ser classificada como nanoemulsão, miniemulsão ou macroemulsão (CRUCHO; BARROS, 2017). Entre essas, destaca-se a polimerização em miniemulsão por conta das muitas vantagens operacionais intrínsecas.

A técnica de polimerização em miniemulsão é geralmente caracterizada pela dispersão inicial de gotículas de monômero em fase aquosa por meio da aplicação de técnicas de alto cisalhamento, como sonificação ou homogeneização de alta pressão. As gotículas são estabilizadas por surfactantes e podem então ser polimerizadas com o uso de iniciadores radicalares solúveis na fase aquosa ou orgânica. Como as gotículas formadas apresentam tamanhos muito reduzidos e altas áreas específicas, iniciadores hidrossolúveis podem adentrar nas gotas de monômero dispersas no meio aquoso (nucleação direta), enquanto iniciadores lipossolúveis iniciam a polimerização diretamente nas gotas que os contêm (nucleação das gotas). A reação se processa então de forma isolada em cada gotícula, de forma que cada gota se comporta como um “nano-reator” (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002). Um esquema do mecanismo da polimerização em miniemulsão está ilustrado na Figura 2.4.

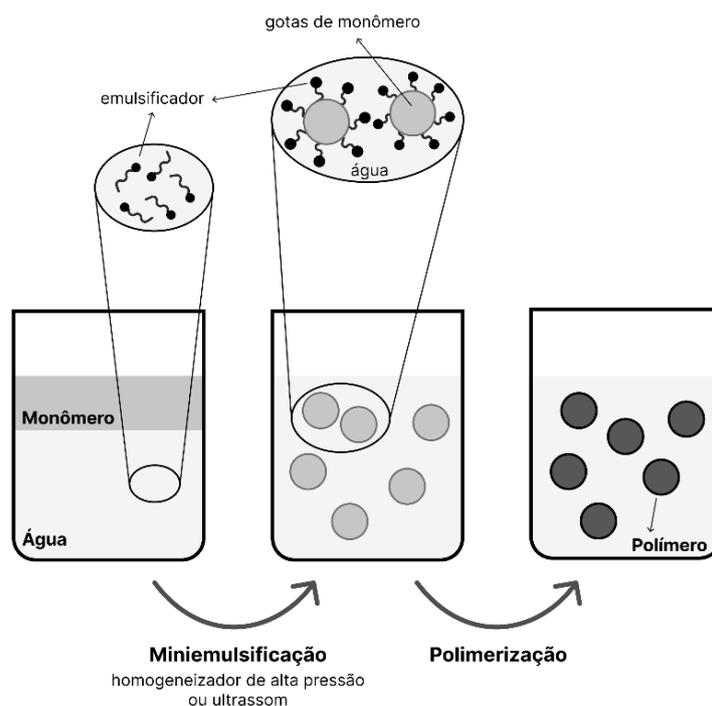


Figura 2.4. Esquema representativo da metodologia de polimerização em miniemulsão. Adaptado de ANTONIETTI e LANDFESTER (2002).

Para o sucesso da polimerização em miniemulsão, devem ser evitados os fenômenos que levam à desestabilização do sistema: a coalescência de gotas e a degradação difusional (*Ostwald ripening*). A coalescência pode ser controlada por meio do uso eficiente de surfactantes. Já o *Ostwald ripening*, caracterizado pela difusão de moléculas de monômero de gotas menores para maiores, demanda o controle de pressão osmótica por meio da adição de um composto insolúvel em água chamado de co-estabilizante (LANDFESTER, 2001). Entre os co-estabilizantes mais usados na literatura estão o n-hexadecano e o álcool cetílico. Por se basear no mecanismo de nucleação direta, a quantidade de surfactantes pode ser reduzida em relação à usada no processo clássico de polimerização em emulsão, em que a nucleação é feita em micelas de surfactante inchadas com o monômero, caracterizando uma grande vantagem do processo (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002; GHARIEH *et al.*, 2019).

A etapa de formação das gotas iniciais de monômero, denominada emulsificação, é fundamental para determinar o diâmetro médio e distribuição de tamanho das nanopartículas poliméricas sintetizadas. Além disso, o diâmetro médio das gotículas também pode ser associado à fração orgânica usada, à solubilidade do monômero na água

e à concentração de surfactantes. A estabilidade coloidal também é fortemente influenciada pelo tipo e concentração de surfactante. Além disso, o co-estabilizante e o uso de homogeneização adequada permitem a condução da reação de forma estável (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002; CRUCHO; BARROS, 2017). Assim, a técnica de polimerização em miniemulsão é um processo multifatorial dependente da formulação escolhida, do método de emulsificação adotado e do tempo reacional.

Entre as técnicas de síntese de nanopartículas discutidas, a polimerização em emulsão e miniemulsão se destacam por serem reprodutíveis, versáteis (em termos de iniciadores) e por utilizarem água como fase dispersa. Em especial, a metodologia de miniemulsão apresenta várias vantagens operacionais, como a redução do uso de surfactantes, fácil controle térmico e facilidade de encapsulamento de ativos *in situ* (principalmente com baixa solubilidade na água) a partir da mistura prévia do ativo com as gotas de monômero originais. Dessa forma, a técnica de polimerização em miniemulsão destaca-se na área de produção eficiente de nanopartículas poliméricas. Diferentes propriedades físico-químicas são facilmente alcançáveis por meio da mudança das condições de polimerização ou copolimerização, esta última constituindo uma importante estratégia para funcionalização de nanocarreadores.

#### 2.4.3 Funcionalização de nanopartículas

O uso de nanopartículas como carreadores de fármacos constitui uma estratégia promissora com vantagens singulares, entre elas o direcionamento específico. Nanopartículas com diâmetros na faixa entre 10 a 500 nm apresentam características de sinalização passiva devido ao acúmulo preferencial em regiões altamente vascularizadas. Este efeito, chamado de efeito de permeabilidade e retenção (EPR), pode contribuir para o tratamento local de tumores e cânceres, já que o surgimento de novos vasos é intensificado pelo desenvolvimento celular descontrolado. Entretanto, o tratamento de doenças baseados no efeito EPR ainda não é totalmente compreendido e pode ser considerado ineficiente (FRIEDMAN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2009).

Portanto, o aumento da seletividade dos nanocarreadores ainda constitui um importante desafio na área da nanomedicina para aumentar a eficácia e minimizar efeitos adversos em tecidos saudáveis. A funcionalização de nanopartículas pode ser retratada

como uma técnica promissora para aumentar a seletividade dos nanocarreadores, pois promove a conjugação de ligantes de interesse em nanopartículas, possibilitando o direcionamento seletivo do nanossistema (ELSABAHY; WOOLEY, 2012; FRIEDMAN *et al.*, 2013; KIM. *et al.*, 2009).

De acordo com a ISO/TS 80004-8:2013, o termo “funcionalização de superfície” pode ser definido como “processo químico que age sobre uma superfície para conferir uma funcionalidade química ou física específica” (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2013). Em particular, a modificação superficial de nanopartículas permite adicionar funções previamente indisponíveis, aprimorando a capacidade de internalização celular, a não toxicidade e o reconhecimento seletivo e específico de nanossistemas (MOUT *et al.*, 2012). Existe uma ampla variedade de ligantes de interesse que podem ser utilizados para funcionalização de nanopartículas, como anticorpos, carboidratos, aptâmeros, dendrímeros, polímeros, surfactantes, biomoléculas e outras moléculas menores (KIM *et al.*, 2009; MOUT *et al.*, 2012). As principais metodologias utilizadas para imobilização de biomoléculas em superfícies poliméricas (Figura 2.5) são a adsorção por interação eletrostática, a interação por afinidade e a formação de ligação covalente (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

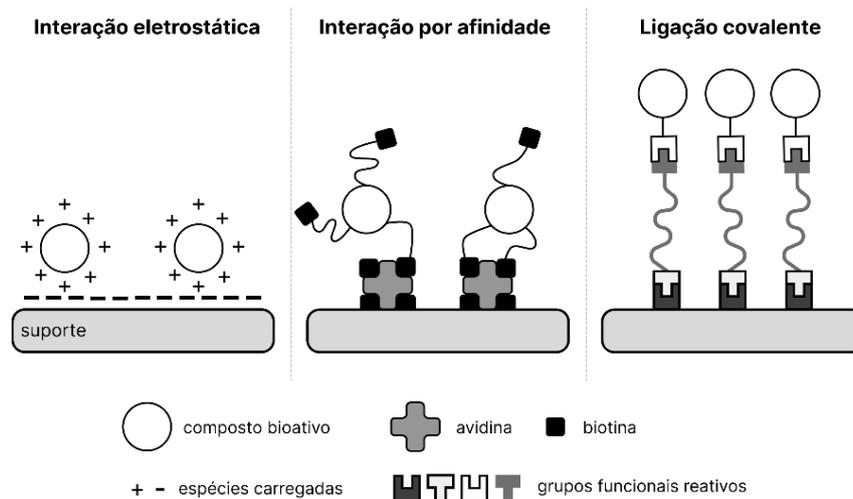


Figura 2.5. Principais mecanismos de imobilização de biomoléculas em superfícies poliméricas. Adaptado de GODDARD e HOTCHKISS (2007).

A técnica de funcionalização mais aplicada é a conjugação química por meio da formação de ligações covalentes. Essa metodologia permite estabelecer uma ligação mais estável entre a biomolécula e o suporte, permitindo aumentar o tempo de meia vida e proteger fisicamente a biomolécula imobilizada. Para possibilitar a conexão covalente, é necessário que a superfície da nanopartícula possua grupos funcionais que possam ser usados na ligação com a biomolécula de interesse (FRIEDMAN *et al.*, 2013; GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

Algumas técnicas químicas podem ser usadas para introduzir grupos funcionais em materiais poliméricos, como as metodologias de química úmida, de imobilização de organo-silanos, de tratamento com gases ionizante, de uso de radiação UV, entre outras (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). Entretanto, essas técnicas podem não ser efetivas por conta do baixo rendimento em grupos funcionais e à sensibilidade biológica da biomolécula de interesse (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). Por essa razão, estratégias baseadas no uso de enxertos intermediários (ou pontes), que podem reagir com a biomolécula e com a superfície polimérica, vêm sendo utilizadas (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

GODDARD E HOTCHKISS (2007) destacaram o uso do ácido acrílico (AA) como agente polifuncional em vários estudos realizados com o objetivo de incorporar os grupos carboxílicos em superfícies poliméricas (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). A adição de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) também é descrita como uma técnica

adequada para a introdução de terminações funcionais para posterior funcionalização com elevada biocompatibilidade (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). De fato, a copolimerização de monômeros com grupos químicos reativos constitui uma estratégia interessante para síntese de látexes poliméricos funcionalizados (GODDARD; HOTCHKISS, 2007; PICHOT, 1990). O uso de copolímeros de P(MMA-AA) para adsorção química de aminoácidos, proteínas e peptídeos já foi validado na literatura, com resultados satisfatórios (CAMPOS *et al.*, 2016; MANGIA *et al.*, 2021). Adicionalmente, o melhoramento da biocompatibilidade da nanopartícula a partir da introdução de comonômeros hidrofílicos, como o AA e o HEMA, (HERMANSON, 2008), justificam o uso como sítios reativos disponíveis para imobilização de biomoléculas com elevada relevância para aplicações biomédicas.

A escolha do agente químico mais adequado depende da natureza da biomolécula e do grupo funcional inserido no suporte polimérico e das condições da bioconjugação, como pH, temperatura e solubilidade dos compostos no meio (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). O agente intermediário mais utilizado para reagir com grupamentos ácidos é a 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)carbodiimida (EDC), que permite a formação de uma ligação peptídica entre o grupo amino da biomolécula e o grupo ácido do suporte. Esse reagente apresenta a vantagem de produzir subprodutos hidrossolúveis e não requerer o uso de solventes orgânicos (HERMANSON *et al.*, 1992). Especialmente no campo de direcionamento ativo ao cérebro, várias biomoléculas e agentes intermediários já foram descritos na literatura. A Tabela 2.1 aponta alguns estudos conduzidos com nanopartículas poliméricas e os prováveis mecanismos de transporte envolvidos.

Tabela 2.1. Exemplos de direcionamento ativo de nanopartículas poliméricas para entrega de ativos ao cérebro.

<b>Ligante/ Agente de direcionamento</b>	<b>Nanopartícula e Agente de funcionalização</b>	<b>Ativo Terapêutico</b>	<b>Resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b>
Transcitose mediada por adsorção			
Peptídeo trans-ativador de transcrição (TAT)  (LIU <i>et al.</i> , 2008)	PEG-colesterol  EDC	Ciprofloxacina	Funcionalização com TAT aumentou a captação celular em neurônios
Albumina (BSA) $\alpha$ 2-macroglobulina fetuína A  (COX <i>et al.</i> , 2019)	Poliisopreno  EDC Adsorção física	Adenosina	Ligação covalente com $\alpha$ 2 aumentou significativamente a captação celular
Transcitose mediada por transportador			
Lectina  (PIAZZA <i>et al.</i> , 2014)	PEG-PLGA  2-iminotiolano	Haloperidol	Funcionalização aumentou de 1,5 a 3x a concentração do fármaco na região de interesse
Lecitina  (GAO <i>et al.</i> , 2007)	PEG-PLGA  2-iminotiolano	Peptídeo intestinal vasoativo	Encapsulamento aumentou estabilidade do ativo e funcionalização aumentou concentração em tecido cerebral
Transcitose mediada por receptor			
Anticorpo monoclonal (8D3)  (FORNAGUERA <i>et al.</i> , 2015)	PLGA-Tween80  EDC	Loperamida	Maior expressão de partículas no cérebro quando funcionalizadas
Transferrina  (MISHRA <i>et al.</i> , 2006)	PEG-albumina  N-succinimidil 3-(2- piridilditio)propionato. (SPDP)	Azidotimidina	Maior acúmulo no cérebro de partículas funcionalizadas mesmo após 4h
Tween80 e apolipoproteína B/E  (KREUTER <i>et al.</i> , 2002)	PBCA  Adsorção física	Dalargina ou loperamida	Efeito clínico foi mais expressado com vetores funcionalizados principalmente com Tween80 que é um ancorador de proteínas

Os exemplos apresentados na Tabela 2.1 confirmam o sucesso do uso do agente EDC para funcionalização de nanopartículas poliméricas na área de sinalização ativa para o cérebro. Além disso, os estudos mostram a variedade de ligantes que estão sendo explorados com o objetivo de permitir a passagem pela BHE. De acordo com KREUTER (2014), o mecanismo de transporte mais atuante para captação de nanopartículas pela BHE é o da transcitose mediada por receptor (KREUTER, 2014). Por isso, a estratégia de funcionalização com ligantes específicos pode permitir maior permeabilidade e, conseqüentemente, mais elevada concentração de nanopartículas no interior do cérebro (SARAIVA *et al.*, 2016).

Receptores de transferrina podem ser ativados pelo uso de transferrina ligante endógena ou anticorpos relacionados a esses compostos; já para os receptores de insulina, podem ser usados anticorpos humanos ou quiméricos (GABATHULER, 2010; SARAIVA *et al.*, 2016). Outro receptor proposto é o de lipoproteínas de baixa densidade devido à ampla variedade de moléculas que podem ser utilizadas, como apoE (apolipoproteína E),  $\alpha$ 2M ( $\alpha$ 2 macroglobulina), APP (proteína precursora amilóide), entre outras (GABATHULER, 2010). Além disso, o uso de surfactantes para revestimento de nanopartículas, como o Tween80, já foi reportado como estratégia capaz de permitir a passagem pela BHE. A hipótese seria de que o surfactante permite a adsorção de proteínas (como as apolipoproteínas) que encontram receptores expressos na BHE, facilitando a passagem das nanopartículas pela barreira biológica (KREUTER, 2001; SARAIVA *et al.*, 2016). Outra abordagem também descrita é o uso de peptídeos.

O uso de peptídeos como vetores moleculares apresenta algumas vantagens em comparação ao uso de anticorpos, como baixa complexidade, reduzida imunogenicidade e custo de produção mais acessível (OLLER-SALVIA *et al.*, 2016). Os chamados peptídeos célula-penetrante (CPP) são peptídeos com até 30 aminoácidos de comprimento, com carga positiva, natureza anfifílica e grande capacidade de interação com membranas lipídicas. Devido à natureza intrínseca, estes peptídeos apresentam alta capacidade de passagem por membranas celulares, permitindo captação independente do uso de receptores celulares. Entre os CPPs avaliados como estratégia de vetorização para o cérebro estão o trans-ativador de transcrição (TAT), Angiopep-2, glutathione (GSH), penetratina, glicoproteína do vírus da raiva (RVG), entre outros (CHEN ; LIU, 2012; OLLER-SALVIA *et al.*, 2016; ZOU *et al.*, 2013).

Com base no que foi exposto, o uso de metodologias de funcionalização de nanopartículas, principalmente as estratégias com vínculos covalentes, permitem incorporação de novas propriedades, como a capacidade de vetorização específica. No campo do direcionamento para o cérebro, vem sendo estudado o uso de diferentes biomoléculas, desde peptídeos até proteínas complexas. Ao utilizar estes ligantes, as nanopartículas podem estar sujeitas a mecanismos de transporte específicos através da BHE, possibilitando a aplicação de concentrações mais elevadas do fármaco no cérebro, sustentadas por maiores períodos.

#### *2.4.4 Mecanismos de liberação controlada em nanopartículas*

Nanocarreadores permitem controlar a liberação espacial e temporal de fármacos encapsulados, tornando a estratégia terapêutica mais eficiente e reduzindo efeitos adversos. O controle espacial ocorre por meio do efeito EPR e de estratégias de sinalização ativa, com uso de ligantes específicos, como já introduzido anteriormente. A modulação de liberação do ativo visa à manutenção da concentração do fármaco no sangue/tecido alvo em uma faixa específica (chamada de janela terapêutica), a fim de garantir a ação terapêutica eficiente sem níveis tóxicos (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017).

Após a administração de um fármaco, a concentração se eleva na corrente sanguínea (Figura 2.6). Em sistemas de liberação tradicionais, após a administração de fármaco em dose alta e única com janela terapêutica estreita, a concentração sanguínea pode aumentar rapidamente e ultrapassar níveis tóxicos, decaindo rapidamente abaixo dos níveis terapêuticos necessários. O uso de doses múltiplas permite minimizar a flutuação de concentração, mas pode gerar desconforto ao paciente. Por isso, procura-se desenvolver uma estratégia de liberação modificada baseada na liberação contínua e

controlada do fármaco (chamada liberação ordem zero), utilizando baixa frequência de dosagem (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017).

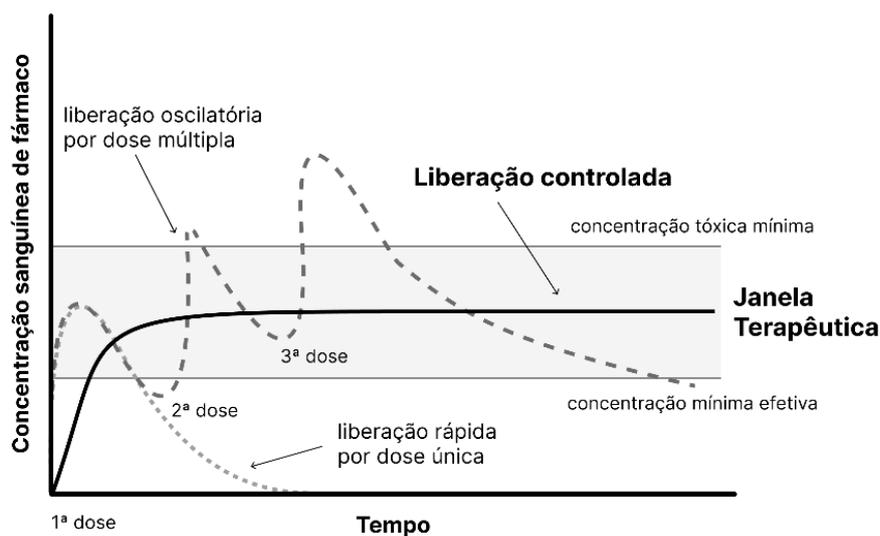


Figura 2.6. Perfis característicos de liberação de fármacos.

Adaptado de LEE e YEO (2015).

Nanocarreadores apresentam alta área específica e reduzida distância de difusão, o que modifica o controle de liberação de ativos encapsulados, em comparação com carreadores clássicos. Além disso, a liberação do nanocarreador é influenciada por diversos fatores, como composição do sistema (polímero, fármaco e excipiente), tipo de interação entre os componentes (física ou química), metodologia de produção do nanossistema, entre outros (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017).

A cinética de liberação pode ser controlada por diferentes mecanismos, como ilustrado na Figura 2.7: (i) difusão do fármaco através da matriz, (ii) efeito de solvente na matriz, (iii) reação química/degradação do material do carreador e, (iv) uso de estímulos externos (PATRA *et al.*, 2018; SON *et al.*, 2017; YAO; WEIYUAN, 2010).

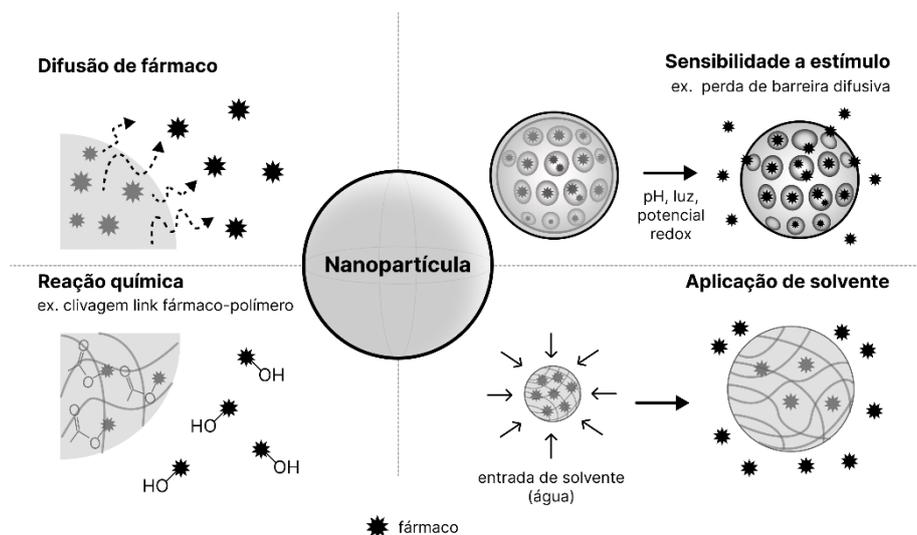


Figura 2.7. Representação dos mecanismos de liberação de fármacos em nanopartículas. Adaptado de LEE e YEO (2015).

O mecanismo de liberação por difusão ocorre em casos em que o fármaco se encontra disperso ou dissolvido no material do nanocarreador. A liberação é regida por gradiente de concentração de fármaco, que se difunde através do material do carreador até liberação no meio (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017). Entretanto, o uso de solventes também pode afetar a liberação de fármacos internalizados em nanocarreadores.

Os solventes podem induzir o inchamento do material e/ou modificar a pressão osmótica do sistema. Carreadores feitos a partir de membranas poliméricas semipermeáveis podem apresentar liberação por osmose, já que a água pode penetrar no nanocarreador, levando o fármaco de uma região interna mais concentrada para uma região mais externa e menos concentrada. Assim, a água pode intensificar a liberação a favor do gradiente de concentração (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017). Já o inchamento pode ocorrer quando sistemas poliméricos hidrossolúveis são usados. O efeito é dúbio e pode ser antagônico: o inchamento pode aumentar o comprimento da rota difusiva, reduzindo o gradiente de concentração e, portanto, diminuindo a velocidade de liberação; mas o inchamento também pode aumentar a mobilidade de cadeia da matriz polimérica, aumentando a mobilidade do fármaco e, conseqüentemente, elevando a taxa de liberação (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). A liberação do fármaco é dependente da taxa de difusão de água e da taxa de relaxamento das cadeias dos polímeros (LEE; YEO, 2015; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008; SON *et al.*, 2017). A maior mobilidade de cadeia

também pode estar presente em polímeros que sofram transições do tipo vítreo-gel, podendo acelerar a difusão do ativo encapsulado (FAN; SINGH, 1989; LANDFESTER, 2009; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008).

A erosão ou a decomposição da matriz polimérica também pode constituir um tipo de mecanismo para a liberação de fármacos quando polímeros biodegradáveis são usados. Reações enzimáticas ou de hidrólise modificam a estrutura do nanocarreador, possibilitando a liberação de ativos encapsulados. A cinética de liberação é influenciada pela taxa de degradação do polímero, massa molar do material, composição química e cristalinidade do sistema. No caso das nanopartículas, o diâmetro reduzido da partícula e a elevada taxa de difusão da água podem levar a uma biodegradação contínua e acelerada (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017).

O uso de estímulos internos e externos, como temperatura, pH, força iônica e campos magnéticos e elétricos, pode também impactar a velocidade de liberação de fármacos internalizados em materiais sensíveis. A possibilidade de localizar esses estímulos em regiões específicas permite que a liberação do ativo seja alvo-específica, como no caso de tratamento de tumores (LEE; YEO, 2015; SON *et al.*, 2017). WANG *et al.* (2016) reduziram significativamente a viabilidade de células tumorais ao combinar o efeito fototérmico com a liberação estimulada por infravermelho de paclitaxel, utilizando um nanocompósito à base de magnetita, pontos quânticos de carbono e sílica (WANG *et al.*, 2016).

Em geral, mais de um mecanismo pode atuar em um mesmo nanocarreador. No caso de nanopartículas poliméricas, os mecanismos mais comuns são degradação da matriz e difusão do fármaco. Entretanto, modificações estruturais, como reticulação, uso de uma matriz de hidrogel e recobrimento da partícula com barreiras semipermeáveis, podem ser usadas para retardar a liberação de fármacos (LEE; YEO, 2015).

Tratando-se de aplicações farmacêuticas, determinar a segurança e eficácia de um produto são cruciais. Assim, elucidar e avaliar a cinética de liberação do fármaco fornece informações críticas acerca da dosagem e do desempenho como estratégia terapêutica (D'SOUZA, 2014; SHEN; BURGESS, 2013). Para isso, podem ser utilizadas metodologias *in vivo* ou *in vitro*, sendo esta última preferível, já que apresenta várias vantagens intrínsecas, como rapidez, uso de materiais mais acessíveis e não utilização de

modelos animais e testes clínicos para realização de testes de desempenho (D'SOUZA, 2014)

Testes de liberação *in vitro* são ferramentas analíticas excelentes para investigação de qualidade e previsão de comportamento *in vivo*. Estes tipos de ensaio já são comumente utilizados para muitas formulações tradicionais, como cápsulas, comprimidos, injetáveis, entre outros (D'SOUZA, 2014). Para nanoformulações, não existem padrões ou regulações bem estabelecidos até o momento, apesar dos recentes avanços e desenvolvimentos na área de nanofármacos. Por isso, vários métodos de liberação *in vitro* têm sido utilizados e relatados (D'SOUZA, 2014; SHEN; BURGESS, 2013).

A avaliação da liberação de fármacos pode ser realizada com auxílio de diferentes técnicas, sendo as mais comuns as técnicas de amostragem, fluxo contínuo e membranas de diálise. Além da metodologia, as escolhas do equipamento, dos parâmetros da análise e da composição do meio de liberação são também variáveis muito importantes para simular as condições encontradas em ensaios *in vivo* (D'SOUZA, 2014; SHEN; BURGESS, 2013). A solubilidade e a estabilidade do fármaco, o pH do meio, a temperatura e a velocidade de agitação são alguns dos parâmetros que devem ser levados em consideração na realização desse tipo de teste e que elevam enormemente a complexidade do ensaio físico-químico (ABOUELMAGD *et al.*, 2015). Há ainda a necessidade adicional de fazer o tratamento matemático dos dados para compreender o mecanismo de liberação das nanoformulações (D'SOUZA, 2014).

Diferentes modelos matemáticos foram descritos na literatura para representar os mecanismos envolvidos no controle de liberação e fazer previsões matemáticas dos desempenhos desses sistemas de liberação (considerando composição, dimensão e geometria para almejar certo tipo de administração e dosagem). Dessa forma, os modelos matemáticos podem constituir importantes ferramentas que podem contribuir com a melhoria da segurança de novos tratamentos e com a redução de tempo e custos para criação e otimização de novos medicamentos (D'SOUZA, 2014; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Os principais modelos matemáticos e suas características estão dispostos na Tabela 2.2 .

Tabela 2.2. Principais modelos matemáticos e suas características para modelagem de perfis de liberação.

Modelo matemático	Considerações
<p>Ordem Zero</p> $Q = kt + Q_0$ <p>(BRUSCHI, 2015)</p>	<p>Liberação constante de fármaco Ideal para sistemas de liberação prolongada</p>
<p>Primeira Ordem</p> $Q = Q_0 e^{kt}$ <p>(BRUSCHI, 2015)</p>	<p>Liberação dependente da concentração</p>
<p>Hixson-Crowell</p> $Q^{1/3} = kt + Q_0^{1/3}$ <p>(HIXSON; CROWELL, 1931)</p>	<p>Sistemas particulados esféricos Alteração de área específica Liberação controlada por dissolução</p>
<p>Higuchi</p> $Q = k\sqrt{t}$ <p>(HIGUCHI, 1963)</p>	<p>Sistemas planares Fármaco homogeneamente disperso em matriz sólida Não considera inchamento e erosão Liberação controlada por difusão</p>
<p>Baker-Lonsdale</p> $\frac{3}{2} [1 - (1 - Q)^{2/3}] - Q = kt$ <p>(BRUSCHI, 2015)</p>	<p>Sistemas esféricos Fármaco homogeneamente disperso em matriz sólida Usado para microparticulados Liberação controlada por difusão</p>
<p>Korsmeyer-Peppas</p> $Q = kt^n$ <p>(KORSMEYER <i>et al.</i>, 1983; RITGER; PEPPAS, 1987a, b)</p>	<p>Equação semiempírica Sistemas de diferentes geometrias Expoente “n” caracteriza o mecanismo de transporte Liberação controlada por difusão, inchamento/relaxamento de cadeias poliméricas ou transporte anômalo</p>

Modelo matemático	Considerações
<p>Weibull</p> $Q = 100 \left( 1 - \exp \left[ \frac{-(t)^b}{a} \right] \right)$ <p>(LANGENBUCHER, 1972)</p>	<p>Adaptação da equação empírica de distribuição de probabilidade  Caráter descritivo e comparativo  Representa a fração acumulada do fármaco liberado</p>
<p>Hopfenberg</p> $Q = 1 - \left[ 1 - \frac{kt}{Q_0 r_0} \right]^n$ <p>(HOPFENBERG, 1976;  KATZHENDLER <i>et al.</i>,  1997)</p>	<p>Sistemas de diferentes geometrias  Expoente “n” caracteriza a geometria  Considera erosão da matriz</p>

Sendo: Q = quantidade de fármaco liberada (%) no tempo t, Q<sub>0</sub> = valor inicial de Q, t = tempo, k,n,a,b = constantes, r<sub>0</sub> = raio inicial

Portanto, o uso de nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos permite modulação da liberação na corrente sanguínea, constituindo uma vantagem considerável em relação às terapias tradicionais, como já relatado previamente. Apesar dos diferentes tipos de mecanismos associados à liberação de fármacos, a difusão e a degradação da matriz são os mais comumente encontrados quando nanopartículas poliméricas são utilizadas. As características físico-químicas do polímero e do fármaco (cristalino/amorfo, dispersão molecular, estado vítreo/elastomérico) são importantes fatores atuantes no mecanismo de liberação, impactando a escolha do nanocarreador mais adequado. O uso de ensaios *in vitro* para determinação da cinética de liberação é, portanto, de extrema relevância para avaliação de desempenho como nanocarreador de liberação continuada.

#### 2.4.5 Avaliação da resposta biológica de nanopartículas

Ao visar o uso de nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos, deve-se atentar para o comportamento dos nanossistemas quando em contato com o

sistema biológico. A elevada energia livre de superfície, dado o tamanho reduzido dos nanocarreadores, promove diferentes interações químicas e físicas em ambientes biológicos, podendo induzir respostas diferenciadas (BAHADAR *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2013; JONES; GRAINGER, 2009). Algumas interações de interesse são internalização celular, alterações em cascatas de sinalização, produção de metabólitos tóxicos, regulação gênica, entre outras. Até o momento, não existe qualquer consenso acerca da toxicidade e riscos associados aos nanomateriais (JONES; GRAINGER, 2009). Por isso, os efeitos biológicos de nanopartículas são testados primeiramente em modelos de cultura celulares e modelos *in vitro*, antes da realização de ensaios *in vivo* (CHO *et al.*, 2013).

Culturas celulares capazes de formar monocamadas (2D) são frequentemente usadas para avaliar temas centrais como a captação celular, a morfologia e o fenótipo celular, o estresse celular, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a viabilidade celular (CHO *et al.*, 2013; JONES; GRAINGER, 2009). As técnicas de microscopia confocal e de citometria de fluxo têm sido constantemente utilizadas para localização de nanopartículas previamente marcadas com agentes fluorescentes, possibilitando avaliar a internalização celular e estudar mecanismos de transporte celular (CHO *et al.*, 2013). ROS são produzidas naturalmente como uma resposta inflamatória ou de estresse celular; por isso, metodologias que quantifiquem esses marcadores, como o ensaio de glutatona, constituem importantes ferramentas para avaliar a viabilidade e a morte celular (JONES; GRAINGER, 2009). Além disso, a toxicidade do nanomaterial pode também ser avaliada por outras metodologias de atividades metabólicas (alterações em cascatas de sinalização, transportes intracelulares e regulações genéticas, por exemplo) e integridade celular (como perturbações na estrutura da membrana e efeitos de apoptose) com métodos colorimétricos de elevada precisão e rapidez (CHO *et al.*, 2013; JONES; GRAINGER, 2009; KROLL *et al.*, 2009).

Os ensaios de cultura 2D podem ser conduzidos com diferentes linhagens comerciais ou primárias. As linhagens mais utilizadas são as células fagocíticas, para mimetizar o comportamento do sistema imunológico; as células hepáticas e glóbulos vermelhos, para verificação de toxicidade em circulação sanguínea; as células epiteliais e endoteliais, para avaliar o transporte de nanocarreadores através de barreiras fisiológicas seletivas; e as células cancerígenas, como modelos de aplicação terapêutica sítio-dirigida (JONES; GRAINGER, 2009). Entretanto, em alguns casos o uso de culturas celulares 2D pode ser limitante para

representação de algumas propriedades geométricas e mecânicas. Por isso, há uma grande tendência para busca e uso de modelos celulares 3D para melhor mimetizar a complexidade das interações célula-célula. Os modelos de culturas de célula 3D mais comumente utilizados são: (i) células cultivadas em estruturas poliméricas (*scaffolds*), (ii) esferóides multicelulares, (iii) combinação de esferóides e *scaffolds*, e (iv) modelos de células multicamadas (CHO *et al.*, 2013). Adicionalmente, a emergência da tecnologia de microfluídica e órgãos-em-chip acrescenta novas possibilidades de estudos na avaliação de nanomateriais para prevenção e diagnóstico de doenças (CHEN *et al.*, 2021).

Após caracterização do comportamento *in vitro*, nanomateriais podem ser testados *in vivo* para confirmação da segurança do uso e eficácia terapêutica. Os ensaios toxicológicos permitem avaliar efeitos em mecanismos moleculares e possíveis alvos de toxicidade induzida pelo uso de materiais não endógenos. Várias metodologias podem ser utilizadas para identificação de ações toxicológicas: estudos de genotoxicidade, avaliação de potencial carcinogênico, detecção de efeitos no desenvolvimento embrionário, ensaios de imunotoxicidade, entre outros (CHO *et al.*, 2013; ROMERO-CASTILLO *et al.*, 2017). O uso de modelos animais permite mimetizar as condições de uma doença, possibilitando antecipar resultados terapêuticos em humanos, sendo, portanto, cruciais para determinação da evolução dos testes para ensaios clínicos (CHO *et al.*, 2013).

Entretanto, cabe ressaltar que ainda existem alguns importantes desafios no campo da avaliação da toxicidade de nanomateriais. Devido à grande variedade das linhagens celulares e dos nanomateriais, ainda não existe uma metodologia padrão para condução de ensaios *in vitro* com nanopartículas voltadas para aplicações biomédicas (JONES; GRAINGER, 2009; KROLL *et al.*, 2009). Além disso, modelos animais têm sido repetidamente contestados quanto à relevância para as doenças humanas e à capacidade de replicar a progressão de uma doença específica (CHO *et al.*, 2013). Ambas as questões ilustram a notável necessidade de criar metodologias e padrões, com o objetivo de obter informações e conclusões confiáveis. Por isso, ressalta-se a importância fundamental de conduzir estudos de toxicidade para avaliar o potencial de utilização das nanopartículas como estratégia para o tratamento e prevenção de doenças.

## 2.5 Nanopartículas poliméricas carreadoras de rivastigmina

Com base no exposto, são notórias as vantagens da aplicação de nanotecnologias para no campo de tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. De fato, o interesse nesta área pode ser corroborado a partir da investigação de artigos de pesquisa originais utilizando os termos “*nanoparticle\**” AND “*Alzheimer’s disease*” na base de dados SCOPUS nos últimos 20 anos (Figura 2.8). Os resultados confirmam o elevado interesse acadêmico na área, observado a partir do crescimento acelerado do número de publicações no tema, que chegam a superar centenas de documentos anuais (Figura 2.7 – A). Ao analisar os países de origem, os três maiores números são atribuídos a países com grande população, talvez devido à questão social e econômica envolvida no tratamento da doença de Alzheimer (Figura 2.7 – B). O Brasil também está presente no *ranking*, empatado em 20º lugar, mostrando também um interesse nacional neste campo. Entretanto, o termo “*nanoparticle*” não é exclusivo aos materiais poliméricos.

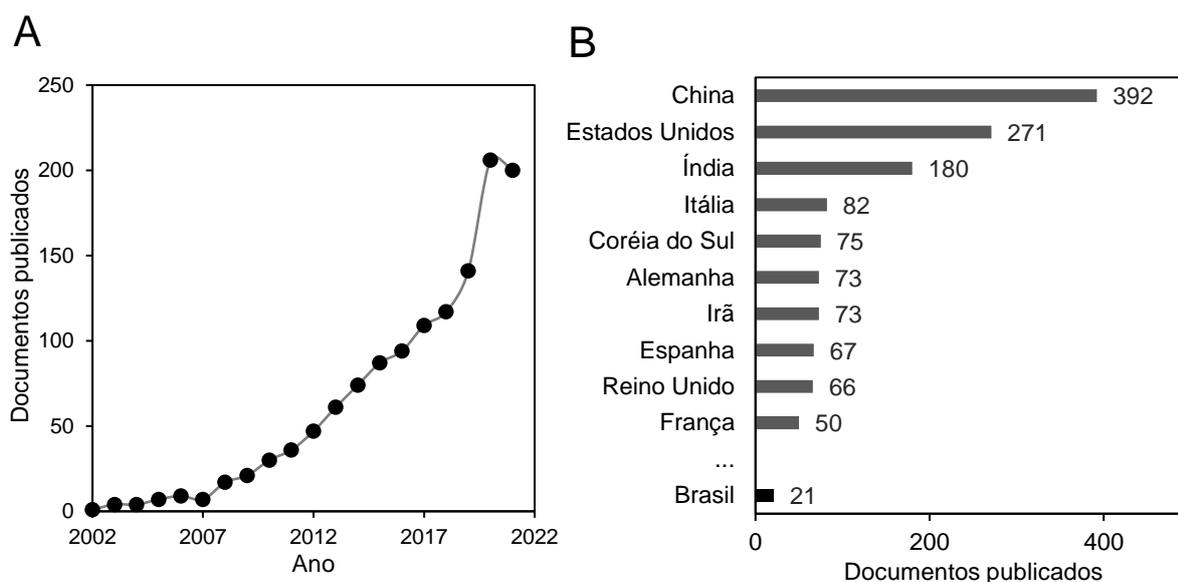


Figura 2.8. Resultados da pesquisa bibliográfica para o número de documentos originais publicados para nanopartículas e doença de Alzheimer na base de dados SCOPUS no período compreendido entre 2002 e 2022.

De fato, os resultados deste levantamento apresentam estudos conduzidos com nanopartículas metálicas, poliméricas, magnéticas e outras no tratamento ou diagnóstico da doença de Alzheimer. Além disso, os estudos corroboram as tendências já apresentadas

na Seção 2.2, já que os alvos das pesquisas são, em sua maioria, as proteínas amiloides e tau. Tendo em vista o insucesso de ensaios clínicos nesse campo, associado ao fato de que o desenvolvimento de um novo medicamento demandaria ainda extensos anos de investigação e aprovação, pode-se inferir que essas tecnologias são ainda muito imaturas.

Por isso, sabendo-se que já existem medicamentos aprovados pela FDA para o tratamento de Alzheimer, o encapsulamento desses fármacos em nanocarreadores poliméricos pode ser especialmente benéfico em relação ao acesso específico e à liberação controlada de fármacos, respeitando a janela terapêutica, reduzindo efeitos adversos e potencializando as estratégias convencionais. Nesse contexto, o encapsulamento de rivastigmina mostra-se atrativo devido à eficácia da molécula (RÖSLER *et al.*, 1999) e a algumas vantagens já discutidas anteriormente, como a sua regioseletividade (KANDIAH *et al.*, 2017).

A rivastigmina é um inibidor pseudo-irreversível enzimático que pode ser encontrado na forma de base livre ou de sal, sendo este último frequentemente usado nas formulações comerciais orais, ou como adesivos transdérmicos (ANNICCHIARICO *et al.*, 2007; PARDO-MORENO *et al.*, 2022). O encapsulamento de rivastigmina procura principalmente aumentar a baixa biodisponibilidade no cérebro após metabolismo no fígado, dada a natureza hidrofílica, assim como reduzir os efeitos adversos associados e intensificar o direcionamento ao cérebro (ROMPICHERLA *et al.*, 2021). As principais lacunas neste campo podem ser compreendidas a partir de um levantamento da literatura sobre o assunto.

Realizando uma pesquisa na base SCOPUS com os termos “*rivastigmine*” AND “*nanoparticle*”, sem restrição de datas, mas excluindo artigos no formato *review*, foram obtidos apenas 80 artigos originais, sugerindo o pequeno número de publicações nessa área específica do conhecimento. Destes 80, foram excluídos os documentos do tipo levantamento bibliográfico, simulações matemáticas, e aqueles que não realizaram estudos de encapsulamento, resultando, assim, em um total de 33 artigos analisados. Uma visão global sobre os artigos analisados é apresentada na Figura 2.9.

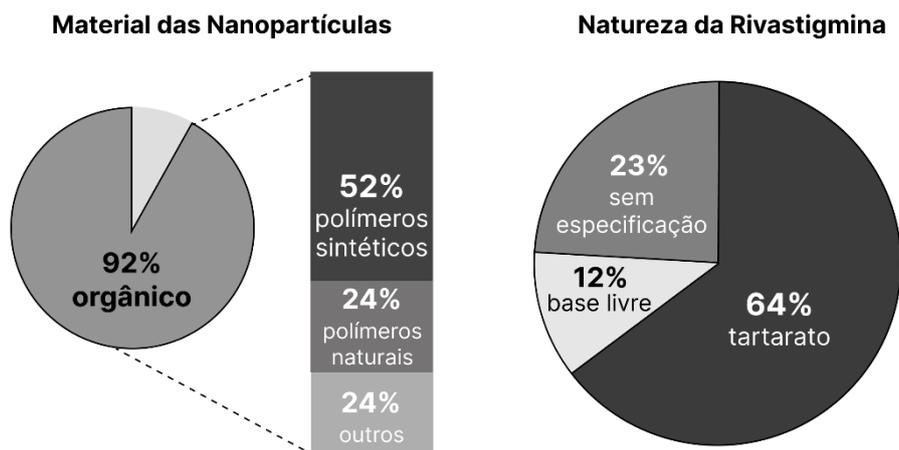


Figura 2.9. Visão global dos trabalhos que investigaram o encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas até o ano de 2022, levando em consideração o material da partícula e a natureza do fármaco.

De acordo com a Figura 2.9, nota-se a supremacia dos materiais poliméricos como constituintes das nanopartículas, em especial os polímeros sintéticos. Esse fato pode ser provavelmente associado à versatilidade de composição dos polímeros sintéticos para atender propriedades específicas, com fácil ajuste durante o processo de produção. Ao considerar a natureza do fármaco, observa-se uma preferência pela versão hidrofílica de sal, o tartarato de rivastigmina (TR), em comparação com a versão hidrofóbica, a rivastigmina base livre (RBL). Entretanto, como já dito, a versão sal apresenta baixa biodisponibilidade no cérebro após o metabolismo no fígado (ROMPICHERLA *et al.*, 2021); por isso, usar a versão hidrofóbica pode ajudar a aumentar a eficácia do nanossistema como carreador para o cérebro. Há ainda estudos que não informaram a natureza da droga usada, impossibilitando maiores investigações sobre o tópico. Assim, tomando-se os estudos com nanopartículas poliméricas sintéticas, foi criada a Tabela 2.3 com algumas observações importantes sobre o tema.

Tabela 2.3. Literatura relacionada à produção de nanopartículas de polímeros sintéticos carregadas com rivastigmina.

<b>Polímero (referência)</b>	<b>Fármaco, Propriedades médias da partícula e eficiência de encapsulamento</b>	<b>Observações</b>
PMMA PMMA-AA (MANGIA <i>et al.</i> , 2021)	RBL 70 a 82 nm -40 a -52 mV >85%	Encapsulamento <i>in situ</i> com alta eficiência e controle de tamanho Funcionalização bem-sucedida Alta captação celular, toxicidade de 50% para 30 µg/mL atribuída ao surfactante
PMA* (TORABI <i>et al.</i> , 2021)	TR 200 a 800 nm	Uso de solventes orgânicos Liberação sustentada por longos períodos 160h 80% de viabilidade celular para 10µg/mL
PLGA (ROMPICHERLA <i>et al.</i> , 2021)	TR 46 a 100 nm -20 mV 15%	Distribuição de tamanho larga e baixo encapsulamento Liberação em duas etapas com máximo de 75% em 60h Rápida eliminação na circulação
PLGA-co-lipídeo (OMAR <i>et al.</i> , 2020)	TR 86 a 120 nm, -36 a -49 mV, 63 a 92%	Partículas com estrutura casca-núcleo Viabilidade celular de 80% para 500 µg/mL Maior concentração de fármaco no cérebro com a funcionalização
MPEG-PCL** (MOHAMADPOUR <i>et al.</i> , 2020)	RBL 100 nm -18 a -38 mV 40%	Liberação em duas etapas completa em 8h Maior concentração no cérebro e tempo de circulação do fármaco com as nanopartículas

\*PMA: poli(metilacrilato), \*MPEG-PCL: poli(metoxi(etilenoglicol)]-co-poli(ε-caprolactona)

<b>Polímero (referência)</b>	<b>Fármaco, Propriedades médias da partícula e eficiência de encapsulamento</b>	<b>Observações</b>
Eudragit  (SALATIN, SARA <i>et al.</i> , 2019)	TR 118 a 154 nm +22 a +31 mV 38 a 56%	Nanocompósito com hidrogel Formato não uniforme Liberação em duas etapas até 80% em 24h Viabilidade celular >60% para 1mg/mL Internalização celular confirmada
PLGA  (SALATIN <i>et al.</i> , 2018)	TR 75 a 173 nm -2 a -10 mV 28 a 46%	Liberação em duas etapas entre 60 e 80% em 24h
PLGA  (HUDA <i>et al.</i> , 2018)	TR 70 a 200 nm -24 mV	Foco principal no desenvolvimento de metodologia analítica
PLGA  (SALATIN <i>et al.</i> , 2017)	TR 75 a 170 nm -2 a -10 mV	Nanocompósito com hidrogel Liberação de até 60% em 24h Viabilidade celular >60% para 1mg/mL Internalização celular confirmada
Eudragit  (SALATIN <i>et al.</i> , 2017)	TR 118 a 154 nm +22,5 a 30 mV 38 a 62%	Liberação em duas etapas de até 78% em 8h constante até 24h

<b>Polímero (referência)</b>	<b>Fármaco, Propriedades médias da partícula e eficiência de encapsulamento</b>	<b>Observações</b>
P(AM-AMPS)*  (HEMMATI <i>et al.</i> , 2016)	RBL	Nanocompósito metálico Máxima liberação de 74% em 7 dias e pH 9 devido à matriz de óxido de grafeno Viabilidade celular > 80% para 1mg/mL
PLGA  (PATEL; GOLI, 2016)	TR  99 a 205 nm -25 a -39 mV 62 a 68%	Combinação com lipídeo Uso de solvente orgânico Liberação em duas etapas com 60 e 72% em 60h Nanopartícula apresentou resultado superior ao fármaco livre <i>in vivo</i>
PLGA  (PATEL; GOLI, 2015)	TR  43 a 200 nm 45 a 78%	Revestimento com quitosana Liberação em duas etapas entre 34 e 62% em 60h Resultado superior ao do fármaco livre <i>in vivo</i>
PLGA PBCA  (JOSHI <i>et al.</i> , 2010)	TR  85 a 168 nm -14 a -34 mV 67 a 76%	Liberação em duas etapas com máxima de 40% em 70h, lentidão associada ao peso molecular Melhora comportamental <i>in vivo</i> com tratamento de nanopartículas
PBCA  (WILSON <i>et al.</i> , 2008)	Não especificado  40 nm -35 mV a -37mV	Revestimento com Tween 80 Liberação em duas etapas com máximo entre 76 e 92% em 24h Aumento da concentração de fármaco no cérebro
PHM**  (CRAPARO <i>et al.</i> , 2008)	RBL e TR  169 a 245 nm -3 a -20 mV	Modificação superficial com PEG Viabilidade celular >90% para 1mg/mL, PEG preveniu captação celular Liberação afetada por meio e estratégia de encapsulamento

\*P(AM-AMPS): poli(acrilamida-co-(ácido acrilamido-2-metil-1-propanossulfônico))

\*\*PHM: poli(metacrilato de hidroxietilaspartamida)

Ao analisar a Tabela 2.3, é possível observar o predomínio do uso de PLGA como polímero sintético. Isso pode ser justificado por algumas características de interesse, como a biodegradabilidade, a elevada biocompatibilidade e a aprovação regulatória, que facilitariam o uso como um nanocarreador de fármacos para liberação controlada a partir de biodegradação (JOSHI *et al.*, 2010). Entretanto, não é incomum notar estudos associados a revestimentos (PATEL; GOLI, 2015), à copolimerização (OMAR *et al.*, 2020; PATEL; GOLI, 2016) ou à síntese de nanocompósitos (SALATIN *et al.*, 2017; SALATIN *et al.*, 2018), o que claramente evidencia a investigação de aspectos relacionados à modificação estrutural destes materiais. Além disso, os trabalhos não estudaram a biodegradabilidade, mostrando que ainda há questões a serem exploradas sobre o uso desses materiais. Deve ser citado ainda o uso de solventes orgânicos na síntese por nanoprecipitação, o que **fortemente impulsiona** a busca por outros polímeros obtidos a partir de procedimentos de síntese menos prejudiciais. De forma geral, os polímeros considerados nos estudos são biocompatíveis, apesar de alguns não serem biodegradáveis, evidenciando que essa característica não seria fundamental para a aplicação de interesse.

As partículas estudadas são geralmente esféricas, com diâmetros menores que 150 nm e com carga superficial negativa. Contudo, não foi mencionada uma especificação de tamanho para a aplicação requerida: o diâmetro é resultante de parâmetros de síntese como viscosidade e natureza e quantidade da fase orgânica. Em relação à eficiência de encapsulamento, o valor nem sempre é mencionado, apesar da importância para produção de carreadores mais eficazes. Apesar disso, nota-se uma grande variabilidade de eficiência de encapsulamento, que variam desde valores moderados até valores altos (acima de 85%), que são dependentes do método de produção da partícula.

Em relação às caracterizações *in vitro*, os estudos de liberação estão entre os mais comuns, mas os mecanismos envolvidos no processo não têm sido investigados a fundo, demonstrando uma lacuna surpreendente no campo de liberação controlada. Outro fato intrigante é que alguns estudos conduziram ensaios *in vivo*, para avaliar modificações da farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco nanoencapsulado, sem realizar ensaios prévios em culturas celulares. Isso definitivamente constitui um campo de muito interesse, já que as interações nano-bio não são totalmente elucidadas. Apesar disso, os resultados *in vivo* são extremamente promissores, incluindo aumento de direcionamento específico ao cérebro e confirmando as vantagens das funcionalizações e coberturas com

surfactantes (JOSHI *et al.*, 2010; MOHAMADPOUR *et al.*, 2020; PATEL; GOLI, 2015; ROMPICHERLA *et al.*, 2021; WILSON *et al.*, 2008).

Este levantamento bibliográfico permitiu concluir que a literatura acerca do encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas é muito escassa, evidenciando a potencialidade para o desenvolvimento de novas competências. Apesar do material PLGA ser amplamente explorado, o uso de solventes tóxicos em sua produção é uma expressiva desvantagem, levando em consideração a aplicação biomédica. Além disso, os resultados promissores *in vitro* e *in vivo* impulsionam a investigação do uso de nanopartículas poliméricas sintéticas com modificações superficiais para direcionamento mais específico ao cérebro. Por fim, a exploração de outros materiais, como copolímeros e nanocompósitos, pode ser também muito atrativa para possibilitar interesses específicos, como liberação controlada e vias de administração menos invasivas. Por isso, é imperativa a investigação de materiais e técnicas de produção de nanocarreadores que sejam mais biocompatíveis e mais eficientes para atuação de liberação controlada e sítio-específica.

## **2.6 Considerações finais**

Neste capítulo foi apresentada uma breve contextualização acerca do uso de nanomateriais, como uma promissora estratégia terapêutica para as doenças do cérebro. As características intrínsecas da nanoescala possibilitam a aquisição de propriedades distintas que são extremamente atrativas para tratamento de doenças em tecidos caracterizados como de difícil acesso, como o cérebro. Particularmente, destaca-se a doença de Alzheimer, cujo desenvolvimento afeta diretamente a condição de vida do indivíduo portador e apresenta uma expectativa alarmante do crescimento de número de casos, com grandes impactos sociais e econômicos. Atualmente, o tratamento aprovado é sintomático, apresentando efeitos adversos indesejáveis e alvo de ação no cérebro, explicitando a necessidade do desenvolvimento de terapias mais eficientes.

O uso de nanopartículas poliméricas pode constituir uma estratégia promissora para a entrega específica de fármacos em diferentes tecidos, levando em conta a versatilidade estrutural e elevado potencial de encapsulamento e de liberação controlada de fármacos. Dessa forma, consegue-se modular as propriedades da nanopartícula a partir

da composição e funcionalização superficial, para melhor controle e direcionamento de fármacos para regiões específicas.

Levando em conta que não há especificação obrigatória acerca do tipo e categoria do material polimérico, materiais biocompatíveis com propriedades de interesse são comumente considerados para esse fim. Por isso, neste trabalho foram escolhidos materiais poliméricos biocompatíveis para a composição majoritária das nanopartículas como o MMA, o AA e o HEMA. O PMMA apresenta vantagens de processamento e aplicações biomédicas já reconhecidas no mercado, constituindo um excelente modelo polimérico biocompatível (ALI; KARIM; BUANG, 2015; GAUTAM *et al.*, 2022). O ácido acrílico foi considerado pela sua eficiência para introdução de grupos funcionais para funcionalização (GODDARD; HOTCHKISS, 2007; MANGIA *et al.*, 2021). O HEMA foi escolhido visando explorar o seu grupo funcional na funcionalização de partículas e a propriedade de formação de hidrogel no mecanismo de liberação de fármaco (ZHANG *et al.*, 2012). Já o acrilato de butila (BA) foi também investigado para avaliar mecanismos de controle de liberação de fármaco a partir da modificação de temperatura de transição vítrea (QIAN; BERKLAND, 2021). Por fim, a rivastigmina base livre foi utilizada como fármaco modelo de tratamento da doença de Alzheimer. Dessa forma, foi possível estudar o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas funcionalizadas carreadoras de fármaco, abrangendo desde a síntese até a avaliação de como ocorre o mecanismo de liberação controlada.

## Capítulo 3. Materiais e Métodos

Este capítulo visa a descrever os materiais e as condições experimentais utilizadas para o desenvolvimento da tese de doutorado. A metodologia é representada de forma geral no fluxograma da Figura 3.1. Caixas cinzas foram utilizadas para assinalar e nomear uma etapa, auxiliando a descrição dos materiais e a discussão dos resultados, que serão apresentadas nos próximos capítulos. Já as caixas brancas apresentam uma descrição sucinta de cada etapa. Ao final do trabalho, foram obtidas nanopartículas poliméricas carreadoras de fármaco, funcionalizadas e com adequado grau de biocompatibilidade.

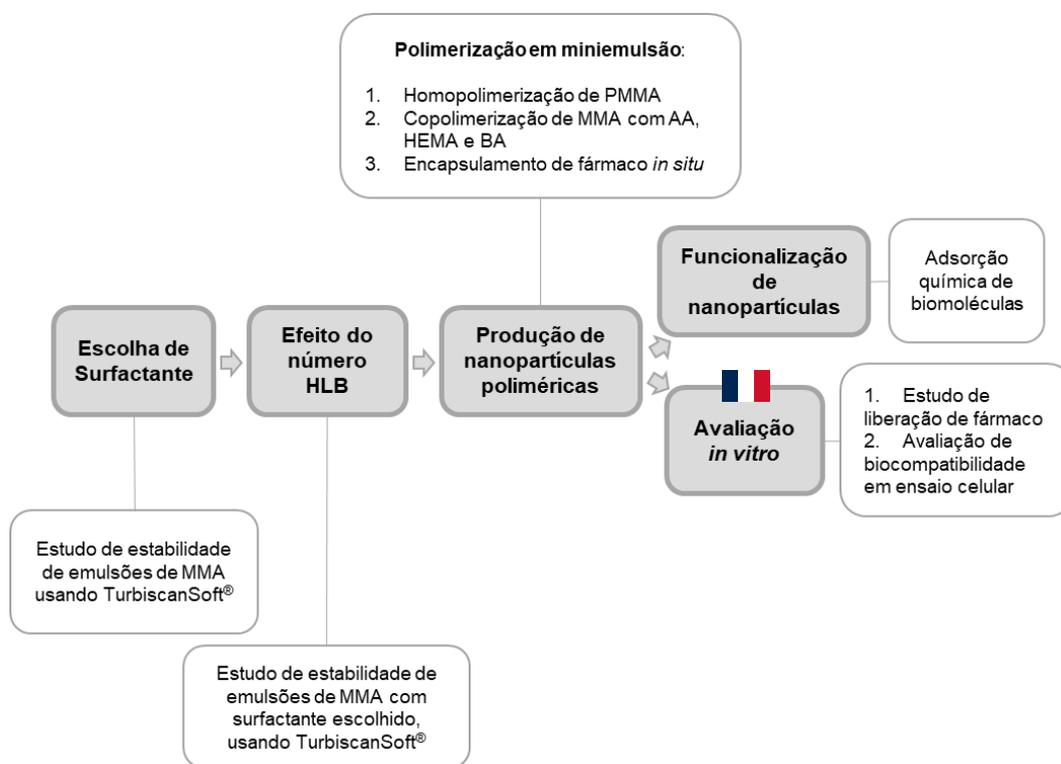


Figura 3.1. Representação esquemática das metodologias adotadas no desenvolvimento da tese de doutorado.

A metodologia foi dividida em etapas com objetivos específicos (Figura 3.1). Primeiramente, descreve-se o procedimento adotado para “*Escolha de Surfactante*”, que objetivou estudar a influência do uso de diferentes tensoativos comerciais sobre a estabilidade da emulsão inicial do monômero modelo MMA em água. Posteriormente, apresenta-se a etapa “*Efeito do número HLB*” (*hydrophilic lipophilic balance* – HLB), conduzida para determinar a concentração mais adequada do surfactante com melhor desempenho na etapa anterior. Com este resultado, seguiu-se para a “*Produção de*

*nanopartículas poliméricas*” que foi realizada utilizando a técnica de polimerização em miniemulsão. Primeiramente, estudou-se o protocolo experimental mais adequado para síntese de nanopartículas nanométricas estáveis com o homopolímero PMMA, para depois seguir com as reações de copolimerização com comonômeros funcionais e encapsulamento de rivastigmina *in situ*. Após a síntese das partículas, foi avaliada a capacidade de “*Funcionalização de nanopartículas*” por meio de uma metodologia de adsorção química. Por fim, as nanopartículas seguiram para a “*Avaliação in vitro*”, quando foi estudado o mecanismo de liberação do fármaco da nanopartícula e a biocompatibilidade do nanomaterial em ambiente biológico utilizando uma cultura celular.

A descrição dos materiais e dos procedimentos experimentais adotados estão descritos nas seções que seguem.

### 3.1 Materiais

Para os ensaios de *Escolha de Surfactante* e *Efeito do número HLB* foram utilizados os reagentes descritos a seguir:

- monômero metacrilato de metila (MMA) adquirido da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,5%;
- surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), contendo 10% de água, adquirido da Labsynth (Diadema, São Paulo);
- surfactante brometo de cetrimônio (CTAB) adquirido da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- surfactante monooleato de sorbitan 80 (Span 80) PA adquirido da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- surfactante polissorbato 80 (Tween 80) PA adquirido da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- surfactante pectina de maçã (PEC) adquirido da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 90%;
- polímero usado como surfactante poli(álcool vinílico) (PVA) com massa molar média de 78 kDa, grau de hidrólise de 88% e pureza de 98% adquirido da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);

- surfactante Pluronic® F-127 (PLU) PA adquirido da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- água deionizada.

Para a realização de *Reações de polimerização em miniemulsão*, além do monômero MMA e dos surfactantes SDS, Tween 80 e Span 80, foram também usados os reagentes descritos a seguir:

- comonômeros: ácido acrílico (AA), adquirido da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil) com 99% de pureza mínima; metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) obtido da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 97% de pureza mínima; e acrilato de butila (BA) doado pela Hexion Química (Curitiba, Brasil);
- fármaco rivastigmina base livre (RBL) adquirido da Carbosynth® (Londres, Reino Unido), com pureza mínima de 98%;
- iniciador persulfato de potássio (KPS) adquirido da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- agente tamponante bicarbonato de sódio PA adquirido da PROQUIMIOS (Rio de Janeiro, Brasil), com 99,7% de pureza mínima;
- agente co-estabilizante n-hexadecano PA adquirido da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil);
- agente paralizante de reação hidroquinona adquirido da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- água deionizada.

Para os ensaios de *Funcionalização de nanopartículas* foram utilizados ainda os reagentes descritos a seguir:

- biomoléculas: o aminoácido lisina, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 98%; a proteína albumina de soro bovino (BSA) adquirida da Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 98% de pureza mínima; e o hormônio insulina humana recombinante adquirida pela SAFC- Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- reagente de ativação 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) carbodiimida (EDC) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 97% de pureza mínima;
- reagente *Bradford* fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);

- reagente orto-ftaldialdeído (OPA), solução completa na concentração de 1 mg/mL, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- solução tampão fosfato pH 6,0 0,1M preparada em laboratório utilizando fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico, ambos fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 99% de pureza mínima;
- solução tampão de tetraborato de sódio pH 9,7 preparada em laboratório utilizando tetraborato de sódio e hidróxido de sódio, ambos fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 97% de pureza mínima.

Para os ensaios de *Avaliação in vitro*, no estudo de liberação de fármaco foram usados:

- solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 preparada em laboratório utilizando cloreto de sódio (NaCl) adquirido da Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido) com pureza mínima de 99,5%, dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) com pureza mínima de 99% e hidrogenofosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) com pureza mínima de 98%, ambos adquiridos da Alfa Aesar (Kandel, Alemanha);
- solução tampão fosfato pH 3,0 0,1M para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparada em laboratório, utilizando sal fosfato monossódico dihidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) adquirido da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha) com pureza mínima de 99%; com ajuste de pH com ácido ortofosfórico 85% adquirido da Fluka (Alemanha);
- acetonitrila com pureza mínima de 99,9% para uso em HPLC, adquirido da VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, França);
- membrana de celulose para diálise Biodesign™ D108 8kDa adquirido da Fisher Scientific (Strasbourg, França);
- filtro de seringa de acetato de celulose 0,2µm adquirido da FiltraTECH (Saint-Jean-de-Braye, França);
- filtro de seringa de microfibras de vidro adquirido da Whatman™ (Buckinghamshire, Reino Unido).

Para os ensaios de *Avaliação in vitro*, na investigação de biocompatibilidade de nanopartículas, os seguintes materiais foram utilizados:

- células endoteliais derivadas de artéria pulmonar humana (HPAEC), isoladas do ramo principal da artéria pulmonar de doador do sexo masculino caucasiano de 23 anos e fornecidas por PromoCell® (Heidelberg, Alemanha);
- meio de cultura celular para crescimento de células endoteliais fornecido pela empresa PromoCell® (Heidelberg, Alemanha), suplementado por um kit SUPERMIX (PromoCell®, Heidelberg, Alemanha) para estimular a proliferação celular, constituído por 2% de soro fetal bovino, 0,4% de fator de crescimento de célula endotelial, 0,1 ng/mL de fator de crescimento de epidérmico, 1 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto, 90 µg/mL de heparina e 1 ug/mL de hidrocortisona;
- kit de reagente de sal de tetrazólio (WST-1) para determinação da proliferação celular fornecido pela Roche (França);
- placas acrílicas de fundo branco com 96 poços estéreis fornecidas pela Sigma Aldrich (Ilkirch, França);
- garrafas de cultura estéreis TPP® de 25 cm<sup>2</sup> fornecidas pela Sigma Aldrich (Ilkirch, França).

A não ser que seja feita referência explícita contrária, todos os materiais foram usados como recebido e sem qualquer tipo de purificação adicional.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Escolha de surfactante

Em reações de polimerização em miniemulsão, a geração de partículas de látex produz essencialmente uma cópia 1:1 das gotículas originalmente dispersas. Assim, a distribuição de tamanhos de partícula é dependente essencialmente do processo de dispersão e da estabilidade das gotas, e não de parâmetros de polimerização (LANDFESTER *et al.*, 1999a). Por isso, o sucesso da síntese de um látex homogêneo e estável é dependente da formação de uma dispersão estável de gotículas de monômero em meio aquoso. A estabilidade coloidal do sistema é principalmente controlada pelo tipo e quantidade de surfactante (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002), o que também pode afetar a qualidade da dispersão das nanopartículas obtidas após a reação de polimerização. Por isso, para que estas gotas mantenham sua forma e tamanho, é necessário o uso eficiente de surfactantes. Tendo em vista que a aplicação almejada do produto deve ser

feita na área biomédica, demanda-se certo cuidado para que estes surfactantes sejam biocompatíveis e não tóxicos.

Nesta etapa do estudo, sete surfactantes comerciais foram avaliados como agentes estabilizantes de emulsões de MMA em água. Como esta emulsão é a etapa precursora da polimerização em miniemulsão, a escolha de um bom estabilizante de emulsão pode impactar significativamente a obtenção de um látex polimérico homogêneo e estável.

Para estudar a estabilidade de emulsões de MMA em água deionizada, foram utilizados surfactantes de diferentes qualidades: (i) iônicos (SDS e CTAB), (ii) não-iônicos (Span 80 e Tween 80) e (iii) poliméricos (pectina, Pluronic e PVA). Para avaliar a estabilidade das emulsões, foram utilizadas como variáveis de estudo:

- a fração orgânica: 10 e 20 %m/m de MMA em relação à massa total da emulsão;
- a massa de surfactante: 1 e 5 %m/m de surfactante em relação à massa de monômero utilizada no ensaio;
- o tipo de surfactante.

O procedimento foi iniciado com o preparo da fase aquosa (FA), fazendo-se a pesagem das quantidades necessárias de surfactante e água deionizada. Para alguns surfactantes (como pectina e PVA), foi necessário o uso de agitação magnética em placa de agitação durante 18/24 horas (modelo C-MAG HS 7, IKA, Staufen, Alemanha). Posteriormente, a massa de MMA necessária para cada ensaio foi adicionada ao recipiente que continha a FA. Os ensaios foram nomeados da seguinte maneira: x%surfactante\_Y%MMA, sendo x% a fração mássica do surfactante e y% a fração mássica de monômero usado. As 28 diferentes composições estudadas estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Emulsões preparadas na etapa de *Escolha de Surfactante*.

<b>Código da amostra</b>	<b>Fração mássica do surfactante (%m/m)</b>	<b>Fração mássica do monômero MMA (%m/m)</b>
1%SDS_10MMA	1	10
5%SDS_10MMA	5	10
1%CTAB_10MMA	1	10
5%CTAB_10MMA	5	10
1%SP80_10MMA	1	10
5%SP80_10MMA	5	10
1%TW80_10MMA	1	10
5%TW80_10MMA	5	10
1%PEC_10MMA	1	10
5%PEC_10MMA	5	10
1%PLU_10MMA	1	10
5%PLU_10MMA	5	10
1%PVA_10MMA	1	10
5%PVA_10MMA	5	10
1%SDS_25MMA	1	25
5%SDS_25MMA	5	25
1%CTAB_25MMA	1	25
5%CTAB_25MMA	5	25
1%SP80_25MMA	1	25
5%SP80_25MMA	5	25
1%TW80_25MMA	1	25
5%TW80_25MMA	5	25
1%PEC_25MMA	1	25
5%PEC_25MMA	5	25
1%PLU_25MMA	1	25
5%PLU_25MMA	5	25
1%PVA_25MMA	1	25
5%PVA_25MMA	5	25

sendo : SDS - dodecil sulfato de sódio, CTAB - brometo de cetrimônio, SP80 - Span80, TW80 - Tween 80, PEC - pectina, PLU- Pluronic, PVA – poli(álcool vinílico) e MMA – metacrilato de metila.

A emulsificação foi feita com auxílio de agitação mecânica promovida por Ultra Turrax (T10 basic, IKA, Staufen, Alemanha) a 14500 rpm durante cinco minutos. A emulsão formada foi vertida em cubeta de vidro específica para análise no equipamento Turbiscan Lab® (Formulaction, Worthington, Estados Unidos). O instrumento se baseia no princípio de dispersão de luz estática para caracterizar dispersões líquidas. As intensidades de transmitância e espalhamento de fundo (*backscattering*) (BS) são monitoradas em função da altura da cubeta e do tempo de análise. Assim, é possível avaliar a mudança de concentração da dispersão, identificando os fenômenos de instabilidade (como sedimentação, cremeação e clarificação) (BRU *et al.*, 2004). Neste ensaio, como foram analisadas amostras concentradas, somente os resultados de *backscattering* foram relevantes.

Para a condução da análise, cada emulsão foi submetida a um protocolo de leitura programado a temperatura ambiente. A leitura foi caracterizada por uma varredura por minuto durante os 10 minutos iniciais, seguida de uma varredura a cada dois minutos até completar 30 minutos totais. Definiu-se 30 minutos como tempo total de análise de varredura, tendo em vista que neste intervalo de tempo atinge-se a conversão completa da reação de polimerização de MMA em miniemulsão (CAMPOS *et al.*, 2016; MANGIA *et al.*, 2021).

As variáveis de saída adotadas para avaliação da estabilidade foram o perfil de desestabilização (leitura de BS como função do tempo de ensaio e altura da cubeta), o valor TSI (*Turbiscan Stability Index* ou Índice de Estabilidade Turbiscan) final e as taxas de migração de clarificação ( $\mu_{cla}$ ) e cremação ( $\mu_{cre}$ ). O cálculo do TSI é baseado na evolução do sinal de BS ou de transmitância da luz em cada altura medida, como mostrado na Equação (3.1) (FORMULACTION, 2019; PASCAUD *et al.*, 2022):

$$TSI(t) = \frac{1}{N_h} \sum_{t_i=1}^{t_{max}} \sum_{z_i=z_{min}}^{z_{max}} |BST(t_i, z_i) - BST(t_{i-1}, z_i)| \quad (3.1)$$

em que  $t_{max}$  representa o tempo total de análise,  $z_{min}$  e  $z_{max}$  são as alturas mínimas e máximas da cubeta,  $N_h=(z_{max}-z_{min})/\Delta h$  é o número de posições de altura na zona selecionada de análise e BST é o sinal considerado (BS, se a transmitância é inferior a 0,2%, ou sinal de transmitância, no caso contrário).

Para o cálculo de  $\mu_{cla}$  e  $\mu_{cre}$  a partir dos dados de BS, o *software* calcula a largura do pico de intensidade máxima na camada de clarificação e cremação, observados experimentalmente nas alturas entre 0 e 15 mm e entre 35 e 55 mm, respectivamente, medidas a partir do fundo da cubeta. Para isso, foi necessário admitir que o índice de refração das gotículas era igual ao índice de refração do MMA puro e que o índice de refração da fase contínua era igual ao índice de refração da água. Foram admitidos como melhores resultados (mais estáveis) aqueles em que se observaram as menores taxas de migração, os menores valores de TSI e curvas de BS sobrepostas. Em todos esses casos, as variações do sinal de espalhamento são os menores possíveis, indicando a maior estabilidade da emulsão.

### 3.2.2 Efeito do número HLB

Após determinar o tipo de surfactante mais adequado para estabilizar emulsões de MMA em água, o número HLB (*hidrophilic lipophilic balance*) foi usado para delimitar a faixa de concentração mais favorável (ICI AMERICAS INC, 1984). O conceito HLB é baseado na atribuição de um número (chamado de “HLB requerido”) a um ingrediente ou conjunto de ingredientes que se deseja emulsionar, no caso a emulsão de MMA em água. Este valor deve ser igual ao número (HLB) de um emulsificante ou mistura de emulsificantes, para que a emulsão final apresente as propriedades desejadas. O HLB dos surfactantes é baseado no balanço do tamanho e força das suas porções hidrofílicas e hidrofóbicas. Emulsificantes de caráter lipofílico apresentam HLB baixo (menor que 9), enquanto os emulsificantes hidrofílicos apresentam HLB alto (acima de 11). Para o caso de uma mistura de emulsificantes, o HLB é calculado a partir da contribuição mássica de cada surfactante da mistura. Dessa forma, a metodologia do sistema HLB pode ser usada como um guia para escolha dos surfactantes mais adequados para uma emulsão de interesse (ICI AMERICAS INC, 1984).

No caso das emulsões de MMA em água, o valor de HLB requerido não é facilmente encontrado na literatura, dificultando a escolha dos surfactantes. Por isso, foi necessário calcular o HLB requerido da emulsão MMA em água deionizada e, para isso, foi utilizado o protocolo experimental descrito por ICI AMERICAS (1984). A metodologia se baseou na construção de uma série de emulsões de MMA em água estabilizadas por emulsificantes com valores de HLB diferentes. Para criar a variação de HLB foram usadas misturas de Tween80 e Span80. Conhecendo-se os valores de HLB para o Tween80 puro (HLB = 15,00) e Span80 puro (HLB = 4,30), foi possível modificar o HLB das emulsões a partir da variação da concentração mássica de cada surfactante presente no meio, conforme ilustrado na Equação (3.2) (ICI AMERICAS INC, 1984).

$$HLB_{mistura} = x HLB_{tween80} + (1 - x)HLB_{span80} \quad (3.2)$$

em que  $x$  é a fração mássica de Tween80 e  $(1-x)$  é a fração mássica de Span80 na mistura de surfactantes.

Para a construção destas emulsões, primeiramente preparou-se a FA a partir da pesagem da massa necessária de Tween80 e de água deionizada em um béquer. Para concentrações elevadas de Tween80, foi utilizada agitação magnética em placa de aquecimento (modelo C-MAG HS 7, IKA, Staufen, Alemanha) para garantir a solubilização do surfactante. Posteriormente, foram adicionadas as quantidades requeridas de monômero e do surfactante oleoso, Span80. A concentração de MMA foi fixada em 25 %m/m da massa total da emulsão, já que os maiores teores de MMA permitem obter maiores rendimentos em nanopartículas poliméricas na etapa seguinte de polimerização em miniemulsão. Os teores mássicos totais das misturas dos surfactantes foram variados em 1, 3 e 5 %m/m em relação à massa de MMA, com o objetivo de avaliar a concomitantemente a influência do valor do HLB e das quantidades de surfactantes sobre a estabilidade das emulsões de MMA em água.

A emulsificação seguiu o mesmo protocolo descrito na seção anterior. Para a análise de estabilidade, parte da emulsão formada foi analisada no equipamento Turbiscan Lab® (Formulation, Worthington, Estados Unidos) seguindo a metodologia descrita anteriormente, e uma segunda porção da emulsão foi usada para cálculo do índice de clarificação (IC). O IC foi determinado a partir da adição de 10 mL da emulsão em proveta de vidro de 10 mL. A altura da coluna de líquido total foi anotada logo após a adição no recipiente (tempo = 0 segundos). Após 24 horas, fenômenos associados à instabilidade das emulsões puderam ser observados na proveta, como a formação de uma fase cremeada, uma fase emulsionada e uma fase clarificada. A altura da fase clarificada (fase transparente) foi anotada e utilizada para cálculo de IC, como indicado na Equação (3.3):

$$IC (\%) = \frac{H_{clarificado}}{H_{inicial}} \times 100 \quad (3.3)$$

em que  $H_{clarificado}$  é a altura da proveta correspondente à fase clarificada (transparente) após 24 horas do processo de emulsificação e  $H_{inicial}$  é a altura da proveta correspondente à emulsão logo após a condução da etapa de emulsificação.

Assim, para avaliação da qualidade de estabilidade das emulsões, foram usados o perfil de desestabilização, o TSI final, as taxas  $\mu_{cla}$  e  $\mu_{cre}$  e o IC da emulsão.

### 3.2.3 *Produção de nanopartículas poliméricas*

As nanopartículas poliméricas foram sintetizadas a partir da técnica de polimerização em miniemulsão descrita por LANDFESTER (2009) e baseada no protocolo experimental descrito por CAMPOS *et al.* (2016) e MANGIA *et al.* (2021).

Primeiramente, realizou-se um estudo para homopolimerização de MMA usando os melhores resultados sugeridos na etapa anterior, visando à determinação de um protocolo experimental para síntese de látex estáveis. Posteriormente, este protocolo foi usado para as reações de copolimerização e de encapsulamento de rivastigmina *in situ*. De forma geral, a metodologia é baseada nas etapas de preparo da FA e FO, seguidas da emulsificação, e posterior polimerização em recipiente adequado. Cada etapa está descrita em mais detalhes a seguir.

A FA foi caracterizada pela presença do surfactante hidrofílico, agente tamponante, iniciador hidrossolúvel e água deionizada. Primeiramente, preparou-se uma solução do iniciador KPS em meio aquoso: cerca de 3 mL de água foram utilizados para solubilização da quantidade desejada de iniciador por agitação magnética em placa de agitação (modelo C-MAG HS 7, IKA, Staufen, Alemanha). Este sistema foi reservado para uso posterior. Em outro recipiente foi solubilizado o conteúdo remanescente da fase aquosa: as quantidades de surfactante (Tween80), agente tamponante (bicarbonato de sódio) e o restante do volume de água. Este sistema também foi homogeneizado por agitação magnética.

Já a fase orgânica (FO) foi composta por monômero MMA, co-estabilizante (n-hexadecano) e o surfactante oleoso (Span80). A título de comparação, também foram conduzidas reações sem Span80, ou seja, usando apenas Tween80 como surfactante. Após pesagem das quantidades desejadas e homogeneização com agitação magnética, a FO foi vertida no recipiente da FA e a solução resultante foi pré-emulsificada com agitação magnética a 100 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a emulsificação foi feita em banho de gelo utilizando sonicador (modelo Vibra Cell VCX 750, Sonics, Connecticut, EUA) com frequência central de 20 kHz, potência máxima de 750 W e amplitude de 60% por 5 min.

Após a etapa de sonicação, os 80 mL do conteúdo reacional foram vertidos no vaso de vidro do mini-reator (modelo Easy Max 102, Mettler Toledo, Ohio, EUA), com capacidade de 100 mL. O equipamento conta com sistema automatizado de controle de

agitação a 800 rpm e de temperatura a 80 °C. Somente quando o sistema atingia 80 °C, a solução aquosa de iniciador era adicionada ao meio, dando início à contagem de tempo de reação, que durou 2 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas ao longo da reação para determinação de conversão de monômero. Ao final da reação, as nanopartículas foram caracterizadas utilizando diferentes análises descritas em mais detalhes na Seção 3.2.6.

A partir dos resultados de caracterização das nanopartículas, também foi investigada a influência da adição de SDS, além do Tween80 e Span80, sobre as características das nanopartículas. Para isso, foram adicionados à FA uma fração de 10 %m/m ou 30 %m/m do surfactante SDS em relação à massa total de surfactantes. Assim, nesses casos a massa total dos surfactantes não iônicos, Tween80 e Span80, somavam 90 %m/m ou 70 %m/m da massa total de surfactantes, respectivamente. As composições dos ensaios experimentais de homopolimerização estão dispostas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Formulações usadas para conduzir as reações de polimerização em miniemulsão. Apenas a composição e o tipo de surfactante foram variados.

<b>Concentração no meio reacional (%m/m)<sup>1</sup></b>				
Metacrilato de metila	n-hexadecano	Persulfato de potássio	Bicarbonato de sódio	Água deionizada
25,00	0,10	0,13	0,10	73,93
<b>Surfactante (%m/m)<sup>1</sup></b>				
	<b>não iônico oleoso</b>	<b>não iônico aquoso</b>	<b>aniônico</b>	
	Span80	Tween80	SDS	
1% m/m_HLB12	0,07	0,18		
1% m/m_HLB14	0,02	0,23		
1% m/m_HLB15		0,25		
1% m/m_HLB14 + 10% SDS	0,02	0,21	0,03	
3% m/m_HLB6	0,63	0,12		
3% m/m_HLB8	0,49	0,26		
3% m/m_HLB15		0,75		
3% m/m_HLB8 + 10% SDS	0,44	0,24	0,08	
5% m/m_HLB6	1,04	0,20		
5% m/m_HLB8	0,81	0,44		
5% m/m_HLB15		1,24		
5% m/m_HLB8 + 10% SDS	0,73	0,39	0,12	
5% m/m_HLB8 + 30% SDS	0,57	0,30	0,37	

1- Percentual em relação à massa total da emulsão.

Para os ensaios de copolimerização e encapsulamento de fármaco *in situ*, foram acrescentadas as massas dos respectivos reagentes na FO. Dessa forma, a FO foi composta pelos monômeros MMA, BA, HEMA e/ou AA, o fármaco rivastigmina base livre (quando presente), o co-estabilizante (n-hexadecano) e o surfactante oleoso (Span80). A proporção dos comonômeros variou entre 5 e 10 %m/m para os comonômeros AA e HEMA, mas foi fixada em 40 %m/m para BA em relação a massa total de monômero. Já para o fármaco, foi estudada a proporção de 1 %m/m e de 0,5 %m/m em relação à massa de monômero. Em relação à FA, a composição utilizada foi similar àquela já descrita anteriormente.

Após o preparo da FA e da FO, seguiu-se para a emulsificação e a reação de polimerização, ambas conduzidas de forma já descritas anteriormente. A nomenclatura das amostras seguiu o seguinte padrão: “nome do (co)polímero”\_“percentual do comonômeros”\_ “valor HLB usado no experimento”\_“percentual mássico de rivastigmina”. Assim, a composição para os ensaios de copolimerização e de encapsulamento de rivastigmina está disposta de forma mais detalhada na Tabela 3.3 a seguir.

Tabela 3.3. Composição do meio experimental para condução das reações de copolimerização e de encapsulamento *in situ* em miniemulsão.

	Concentração no meio reacional (%m/m) <sup>1</sup>											
	FO						FA					
	MMA	AA	HEMA	BA	Rivastigmina	n-hexadecano	Span80	Tween80	SDS	KPS	Bicarbonato de Sódio	Água
PMMA_HLB6	24,88					0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,56
P(MMA-HEMA)10%_HLB8	22,39		2,49			0,10	0,57	0,30	0,37	0,12	0,10	73,56
P(MMA-BA)40%_HLB6	14,93			9,95		0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,56
P(MMA-BA-HEMA)_HLB6*	12,44		2,49	9,95		0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,56
P(MMA-BA-AA)_HLB6*	12,44	2,49		9,95		0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,56
PMMA_HLB8_1%R	24,81				0,25	0,10	0,56	0,30	0,37	0,12	0,10	73,37
PMMA_HLB6_0,5%R	24,84				0,12	0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,47
P(MMA-AA)5%_R	23,60	1,24			0,12	0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,47
P(MMA-AA)10%_R	22,36	2,48			0,12	0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,47
P(MMA-BA)_R**	14,91			9,94	0,12	0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,47
P(MMA-BA-AA)_R*	12,42	2,48		9,94	0,12	0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,47
P(MMA-BA-HEMA)_R*	12,42		2,48	9,94	0,12	0,10	0,73	0,14	0,37	0,12	0,10	73,47

1- Percentual em relação à massa total da emulsão.

\* Terpolímero produzido usando 40% de BA e 10% AA ou 10% HEMA.

\*\* Copolímero produzido usando 40% de BA.

### 3.2.4 Funcionalização das nanopartículas

A capacidade de imobilização de biomoléculas foi avaliada por meio de um ensaio de adsorção química utilizando o intermediário EDC. De acordo com o esperado, a imobilização é realizada por meio de uma ligação covalente criada entre o terminal ácido, presente na nanopartícula, e um grupo amina, existente na biomolécula de interesse. A fim de avaliar e investigar a potencialidade de funcionalização das nanopartículas, biomoléculas de diferentes massas molares foram utilizadas: o aminoácido lisina, a proteína albumina de soro bovino (BSA) e o hormônio insulina.

A metodologia de imobilização em nanopartículas utilizada foi baseada no protocolo descrito por HERMANSON (2008), validado por resultados de sucesso de estudos anteriores, e pode ser caracterizada por uma etapa inicial de ativação seguida de bioconjugação (CAMPOS *et al.*, 2016; HERMANSON, 2008; MANGIA *et al.*, 2021). Primeiramente, adicionaram-se 1 mL de látex polimérico e 1,5 mL de solução de EDC 0,05 mol/L (em tampão fosfato pH 6,0 0,1 M) em um recipiente vedado. Este foi mantido sob agitação a 20 rpm durante 2 horas em rotor giratório (modelo Roto-Shake Genie, Scientific Industries, Bohemia, Estados Unidos da América). Depois, o conteúdo foi vertido em um sistema de membrana Amicon Ultra-15 100kDa (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e levado à centrifugação a 6000 rpm por 10 min (em centrífuga modelo Thermo Scientific Centrifuge-Megafuge 16 R, Termo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América).

Posteriormente, seguiu-se para a etapa de conjugação biológica com a ressuspensão das nanopartículas em 1 mL de tampão fosfato pH 6,0, seguida da adição da biomolécula e repetição do ciclo de agitação (a 20 rpm e 2 horas) e centrifugação (6000 rpm por 10 min utilizando membrana Amicon Ultra-15 100kDa). A concentração da biomolécula foi variada, dependendo do seu peso molecular e superfície de contato disponível: 40 mg de lisina, 28 mg de BSA e 250 µL de uma solução de 32mg/mL de insulina em tampão fosfato pH 6,0.

Ao final da segunda centrifugação, recuperaram-se as nanopartículas funcionalizadas no retido e as biomoléculas não imobilizadas no filtrado. O retido foi seco em estufa de recirculação a 80 °C para caracterização qualitativa de adsorção por espectroscopia infravermelha de Fourier (FTIR), enquanto o filtrado foi levado à análise em espectrofotômetro UV-VIS (modelo UV-M51, Bel Photonics, Piracicaba, Brasil) para

quantificação de biomolécula não adsorvida e cálculo de eficiência de funcionalização a partir de uma curva padrão.

Para avaliação de lisina não adsorvida, foi usado o protocolo do reagente OPA: 5 µl de amostra diluída foram adicionados a 200 µL de reagente OPA e, após 2 min, a mistura foi lida a 340 nm. A concentração foi calculada a partir de uma curva padrão de lisina em tampão tetraborato de sódio (pH 9,7), utilizando o mesmo protocolo. Já para quantificação de BSA e insulina não adsorvidos, optou-se por utilizar o método *Bradford*: 100 µL de amostra foram adicionados a 1 mL de reagente *Bradford* e, após 10 min, a mistura foi lida a 595 nm. A concentração foi obtida por meio da comparação com uma curva padrão de BSA em água.

A escolha das amostras de nanopartículas variou de acordo com a biomolécula utilizada. Primeiramente, lisina foi utilizada como um modelo inicial de biomolécula para funcionalização das nanopartículas PMMA\_HLB6, P(MMA-BA)40%; P(MMA-HEMA)10%, P(MMA-BA-HEMA) e P(MMA-BA-AA). A partir do sucesso do ensaio anterior, foram conduzidos os ensaios de imobilização de BSA e insulina nas nanopartículas carreadoras de rivastigmina: P(MMA-BA)+0,5%R, P(MMA-BA-AA)+0,5%R e P(MMA-BA-HEMA)+0,5%R. Dessa forma, foi possível avaliar a capacidade das nanopartículas como veículos carreadores de fármaco com modificação superficial com biomoléculas.

### 3.2.5 Avaliação *in vitro*

O desempenho das nanopartículas para liberação controlada e as respectivas biocompatibilidades foram avaliadas em condições específicas controladas *in vitro* testadas nos laboratórios RAPSODEE (IMT Mines Albi) e Centre de Recherche Cardio Toracique de Bordeaux, respectivamente, como descrito nos parágrafos seguintes.

#### 3.2.5.1 Liberação do fármaco

A análise da liberação do fármaco encapsulado apresenta forte relevância para caracterização de um nanocarreador com um sistema de liberação controlada. Entretanto, não há protocolos de ensaios específicos para nanomateriais (SHEN; BURGESS, 2013) e a descrição de métodos para rivastigmina base livre encapsulada é inexistente, mesmo em organizações internacionais de referência como *Food and Drug Administration* (FDA) e *United States Pharmacopeia* (USP). Por isso, a metodologia utilizada foi

baseada na literatura, especificamente em artigos com estudos de liberação *in vitro* de nanopartículas encapsuladas com rivastigmina base livre (CRAPARO *et al.*, 2008; HEMMATI; SAHRAEI; GHAEMY, 2016; MOHAMADPOUR *et al.*, 2020).

A cinética de liberação *in vitro* foi avaliada pelo método de diálise em condições *sink*. Foram utilizadas nanopartículas em formulação de suspensão (látex) e sólida, esta última previamente liofilizada usando o Liofilizador L202 (Liotop, São Paulo, Brasil). Os nanocarreadores foram inseridos em sacos de diálise (MWCO = 8 kDa) em concentração equivalente a 2,17 mg de rivastigmina encapsulada. As membranas de diálise foram imersas em 100 mL de tampão PBS (pH 7,4) dispostos em vasos de vidro em aparato de dissolução USP II AT Xtend™ Sotax (Saint-Louis, França). A agitação foi controlada a 50 rpm e a temperatura fixada em 37 °C durante 24h.

Alíquotas de 1,1 mL foram retiradas em intervalos de tempo específicos e filtradas usando filtros de seringa de 0,22 µm. A concentração de rivastigmina liberada no meio foi quantificada por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) usando equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity II (Santa Clara, Estados Unidos da América) equipado com coluna XTERRA RP18 5µm 3,9 x 150mm Waters (Milford, Estados Unidos da América).

O método HPLC utilizado foi adaptado da literatura (RAO, B. M. *et al.*, 2005): a fase móvel era constituída de 20 partes de acetonitrila e 80 partes de tampão fosfato pH 3 0,1M (base volumétrica), vazão de 0,7 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção por UV a 212 nm. A concentração de rivastigmina pode ser determinada a partir de uma curva de calibração construída com soluções de 0,8 a 50 µg/mL de rivastigmina em tampão PBS a 212 nm.

Os ensaios de liberação foram realizados em triplicata com as seguintes amostras: PMMA+0,5%R, P(MMA-AA)5%\_0,5%R, P(MMA-BA)+0,5%R, P(MMA-BA-AA)+0,5%R e P(MMA-BA-HEMA)+0,5%R. Experimentos controle foram realizados com solução de fármaco 2,17 mg/mL em tampão PBS nas mesmas condições.

Os resultados foram expostos na forma de curva cinética e também tratados no software *KinetDS* (MENDYK *et al.*, 2012) para ajuste de diferentes modelos matemáticos e determinação de possíveis mecanismos de liberação.

### 3.2.5.2 Análise de segurança com ensaio biológico

A avaliação da toxicidade do nanomaterial é de grande importância, especialmente por conta da potencial aplicação terapêutica pretendida. A inexistência de uma metodologia específica para avaliação de toxicidade de nanomateriais impulsionou o uso de protocolos baseados em kits de toxicidade celular e na literatura científica. É importante ressaltar que a área de nanotoxicologia está em constante evolução e poucas células endoteliais têm sido usadas como modelos *in vitro* para testes com nanopartículas (JONES; GRAINGER, 2009), o que constitui uma contribuição valorosa e inovadora neste campo de pesquisa.

Para os ensaios de segurança celular foram usadas células endoteliais humanas derivadas da artéria pulmonar (CEH). A escolha desta linhagem é justificada pela elevada dificuldade de se obter bancos de células da BHE para ensaios *in vitro* e pelo fato das células endoteliais da artéria possuírem a mesma origem celular da BHE e serem derivadas de humanos, se aproximando do modelo celular requerido para o estudo. Inicialmente, as células CEH foram descongeladas, em seguida plaqueadas e cultivadas em meio de cultura celular suplementado com SUPERMIX em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa com atmosfera umidificada com 5 %v de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 48h.

Após este período, as células foram lavadas com solução tampão (HEPES) e tratadas com tripsina durante 2 min. Em seguida, as células foram isoladas, centrifugadas e recolhidas para contagem celular. As células foram então semeadas em placas de 96 poços de fundo transparente com densidade de 20x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> com meio sem corante suplementados com SUPERMIX, e mantidas em estufa a 37 °C e 5 % vol de CO<sub>2</sub> por 24 horas (DEWEIRDT *et al.*, 2020). Posteriormente, o meio nutritivo foi retirado e substituído por um meio de cultura sem corante, e na presença de diferentes concentrações das soluções de nanopartículas.

As formulações de nanopartículas escolhidas para avaliação de toxicidade de material foram os brancos PMMA\_HLB6, P(MMA-BA)40% e P(MMA-BA-AA). Primeiramente, foi feita uma solução mãe de 250 µg/L de nanopartículas preparada após vigorosa homogeneização de cada látex com 3 ciclos de 30s em sonicador e 30s em vórtex. Nove diluições seriadas foram realizadas a partir da solução mãe, criando uma variação de teste de 250 µg nanopartículas/L a 1 µg nanopartícula/L em volume final de 200 µL/poço. Para controle celular, 7 poços por placa não receberam a solução de

nanopartículas diluídas. Após o tratamento com as diferentes concentrações de nanopartículas, a placa foi cultivada em estufa a 37 °C e 5 %vol de CO<sub>2</sub> por 24 h. Para este experimento, foram utilizadas quatro replicatas.

Após as 24 h, a viabilidade celular foi testada a partir da incubação de células com 20 µL do reagente WST-1 por 3h sob agitação (DEWEIRDT *et al.*, 2020). O ensaio de WST-1 é baseado no cálculo de viabilidade celular a partir da atividade metabólica, o reagente reage com o succinato-tetrazólio redutase mitocondrial formando o corante formazano, detectável em espectrofotômetro (NGAMWONGSATIT *et al.*, 2008). Após o período de incubação, a placa seguiu para leitura a 450 nm em leitor de espectrofotômetro de microplacas (SPECTROstar-Nano2.10, BMG Labtech®, Alemanha). A viabilidade celular foi avaliada por meio do resultado da leitura, que é proporcional às células vivas. O cálculo das células viáveis foi realizado por meio de regressão linear, tomando-se o controle celular como 100% viável.

### 3.2.6 Caracterização físico-química das nanopartículas

Diversas técnicas de caracterização foram aplicadas para avaliar as características físicas, como forma e tamanho, e químicas das nanopartículas. As caracterizações realizadas estão descritas nos parágrafos seguintes.

#### 3.2.6.1. Composição química

A composição química das nanopartículas foi avaliada por meio das técnicas espectroscópicas na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

#### *Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Neste trabalho as análises de FTIR foram conduzidas visando à identificação dos grupos químicos presentes nas nanopartículas. Dessa forma, foi possível observar os grupos funcionais característicos dos materiais poliméricos, assim como as modificações químicas ocasionadas pelo processo de funcionalização.

Para isso, foi utilizado o equipamento Cary 630 FTIR com módulo de amostragem ATR (Agilent, California, Estados Unidos da América) para radiação eletromagnética direta na amostra sólida. A absorção de radiação em certos comprimentos de ondas é representada na forma de um espectro de bandas, o qual possibilita a identificação de certas estruturas químicas da amostra (CHEREMISINOFF, 1996). Especialmente na

região do infravermelho, podem ser observadas frequências vibracionais relacionadas a grupos funcionais, conformação e estrutura de macromoléculas de interesse especialmente relevante no presente trabalho.

As análises de FTIR foram conduzidas na região 4000 – 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro final foi reportado como a média de 128 varreduras, calculados automaticamente pelo equipamento.

#### *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Assim como a técnica de FTIR, a análise de RMN foi aplicada com o objetivo de identificar grupos químicos específicos nos materiais poliméricos sintetizados e particularmente para detectar a presença de monômero residual e do fármaco e avaliar a incorporação dos comonômeros utilizados nas reações de copolimerização.

A análise de RMN de hidrogênio foi conduzida em amostras previamente solubilizadas em clorofórmio deuterado em equipamento AVIII-500, Bruker (Massachusetts, Estados Unidos da América) com sonda de 5 mm na frequência de 400 MHz.

A identificação de características estruturais de um material por RMN se baseia no realinhamento do núcleo atômico após aplicação de um campo magnético. Dependendo do ambiente químico do átomo de interesse (ligações químicas com a sua vizinhança) e do campo magnético aplicado, a energia de alinhamento é diferente, permitindo identificar a estrutura molecular e a composição química do material (CHEREMISINOFF, 1996).

Entre os núcleos mais explorados para a análise, foi escolhido o  $^1\text{H}$  devido à adequabilidade para análises de copolímeros com PMMA (CAMPOS *et al.*, 2016; EROLA *et al.*, 2015; VARGÚN *et al.*, 2010).

#### *3.2.6.2 Conversão de monômero*

A conversão de monômero foi medida ao longo e ao final das reações de polimerização a partir da técnica de gravimetria. As alíquotas eram depositadas em recipientes de vidro contendo 3 gotas de uma solução contendo um inibidor de polimerização (1 % m/m hidroquinona em água). Em seguida, os recipientes eram levados para secagem em estufa de circulação de ar a 80 °C, possibilitando a evaporação do

monômero volátil não reagido. O cálculo de conversão foi feito com base na pesagem do recipiente em vários momentos, conforme indicado na Equação (3.4)(3.4)

$$\%C = m_{pol\ seco+recipiente} - (m_{recipiente} + m_{hidroquinona}) \times \varphi_{orgânica} \times m_{amostra} \quad (3.4)$$

em que %C é a conversão calculada,  $m_{pol\ seco+recipiente}$  é a massa seca,  $m_{recipiente}$  é o peso do recipiente vazio,  $m_{hidroquinona}$  é a massa de solução de hidroquinona adicionada,  $\varphi_{orgânica}$  é a fração mássica de fase orgânica e  $m_{amostra}$  é o peso da amostra de látex retirada do sistema.

### 3.2.6.3 Eficiência de encapsulamento (%EE) de fármaco

O cálculo da eficiência de encapsulamento de RBL foi baseado na quantificação de fármaco livre, ou seja, não encapsulado. Por meio do balanço de massa do fármaco, conseguiu-se determinar a concentração de fármaco encapsulado.

Para isso, 1 mL de látex foi inserido em membrana de centrifugação Amicon Ultra-15 100kDa (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e levados à centrífuga Megafuge 16 R Thermo Scientific (Massachusetts, Estados Unidos da América) por 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi coletado e a quantidade de RBL livre foi determinada usando espectroscopia UV a partir da construção de uma curva padrão.

A curva de calibração foi construída utilizando soluções de 1,5 a 7,5 mg/mL de RBL em água deionizada. Primeiramente, as soluções foram lidas na faixa de comprimentos de onda compreendida entre 200 e 500 nm com passo de 1 nm para determinação de 261 nm como o comprimento de onda de análise. Para a realização das leituras, 10  $\mu$ L de amostra eram depositados em cada poço da placa de quartzo Thermo Scientific™  $\mu$ Drop™ Plate (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) no espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América).

Para o cálculo de eficiência, o procedimento de centrifugação era realizado em triplicata. O látex de PMMA sem fármaco também foi analisado para ser usado como “branco” de leitura.

#### 3.2.6.4 *Massa molar*

A massa molar média e a curva de distribuição de massas molares dos polímeros foram determinadas por meio da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). Para isso, foi utilizado o cromatógrafo Viscotek modelo GPC Max VE 2001 (Houston, Estados Unidos da América) equipado com o detector refratométrico modelo VE 3580 e o conjunto de colunas lineares Shodex (modelos KF-48804L e KF-805L de tamanhos máximos de poro de  $1,5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$  Å). Esta técnica permite separar as moléculas de uma solução polimérica, de acordo com o respectivo tamanho de cadeia, a partir da permeação de uma fase móvel em uma coluna porosa (fase estacionária) (CHEREMISINOFF, 1996).

Neste trabalho, 0,006 g de amostra seca foram diluídos em 1 mL de tetrahidrofurano (THF) para preparar as soluções poliméricas. A fase móvel utilizada foi THF em vazão constante de 1,0 mL/ min a 40 °C. O equipamento foi previamente calibrado com padrões de poliestireno com massas molares na faixa de  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  Da.

#### 3.2.6.5 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A análise microscópica de materiais poliméricos pode identificar aspectos relacionados à morfologia, à regularidade da superfície e até de agregação de partículas e depósito de sólidos na superfície. No caso de particulados com tamanhos médios entre 10 nm e 1  $\mu$ m, a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas que podem ser utilizadas. As amostras podem ser visualizadas sem pré-tratamento prévio, mas técnicas para aumentar o contraste podem ser aplicadas (CHEREMISINOFF, 1996).

Aqui, as análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Quattro S Thermo Fisher (Massachusetts, Estados Unidos) equipado com um canhão de emissão de campo. Os materiais poliméricos liofilizados foram previamente recobertos com platina utilizando um metalizador Polaron Range SC7640 (Hertfordshire, Inglaterra) a 1kV durante 2 minutos.

#### 3.2.6.6 *Tamanho de partícula e potencial zeta*

Outras caracterizações importantes realizadas foram a determinação de tamanhos médios de partícula e de potencial zeta. Ambas foram realizadas com o analisador modelo

ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) a partir de uma amostra diluída de látex.

Para a análise de diâmetro de partícula, o látex foi diluído em água deionizada na proporção 1:75 em massa e inserido em cubeta de quartzo. A técnica é baseada no espalhamento dinâmico da luz. O equipamento emite um feixe de luz que, ao atravessar a amostra, se choca com o material particulado suspenso, espalhando a luz. Por meio da relação de Stokes consegue-se determinar o diâmetro médio das partículas (HACKLEY, 2015). Neste trabalho, o resultado foi gerado a partir de uma média aritmética de três medidas de 100 leituras.

Já a análise de potencial zeta se baseia no espalhamento de luz eletroforético, com o cálculo da mobilidade eletroforética do material particulado. Para esta análise, a amostra diluída previamente foi inserida em cubeta de vidro onde foi acoplado o kit de célula de imersão universal do mesmo fabricante do equipamento. O cálculo do potencial zeta foi realizado utilizando a equação de Smoluchowski (BHATTACHARJEE, 2016) e a medida final foi resultado de uma média aritmética de três medidas com 100 leituras cada.

#### *3.2.6.7 Temperatura de decomposição e temperatura de transição vítrea*

Uma propriedade de material que pode ser modificada por meio da copolimerização é a resposta térmica. Para investigar essa possibilidade, análises termogravimétricas (TGA) e de varredura diferencial de calorimetria (DSC) das amostras liofilizadas foram conduzidas.

Em análises de TGA, é registrada a perda de massa de amostra com o aumento programado de temperatura provocado por um programa específico do equipamento. Dessa maneira, consegue-se associar a perda de massa com a volatilização de líquidos e a decomposição de sólidos (CHEREMISINOFF, 1996). Neste trabalho, foi usado o equipamento Discovery TGA55 TA Instruments (New Castle, Estados Unidos da América) e as análises foram conduzidas com aquecimento na faixa de 25 a 700 °C, a uma taxa de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio a 20 mL/min.

Em análises de DSC, a diferença de energia entre um material de referência e a amostra é medida para um programa específico de temperatura controlada. Esse diferencial energético corresponde a mudanças na entalpia e calor específico da amostra

que podem ser relacionados a eventos químicos e físicos atuantes. O DSC é frequentemente usado para determinação particular da temperatura de transição vítrea (Tg) de polímeros (CHEREMISINOFF, 1996).

Para condução dos ensaios de DSC, foi usado o equipamento DSC Q200 TA Instruments (New Castle, Estados Unidos da América) em modo modulado. O dispositivo foi previamente calibrado com índio para temperatura e entalpia, e com safira para a capacidade calorífica. As análises foram conduzidas em atmosfera de nitrogênio seco a 50 mL/min, com variação de temperatura de -80 a 200 °C a uma taxa de 2 °C/min, com amplitude de 0,8 °C e período de 40 s. As amostras foram mantidas em cadinho de alumínio não hermético durante todo o evento. Para determinação de Tg foi usada a primeira curva de aquecimento do sinal correspondente ao fluxo de calor ligado à mudança de capacidade calorífica (*reverse heat flow*).

## Capítulo 4. Estudo de estabilidade de emulsões de MMA e da síntese de nanopartículas de PMMA

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos no estudo de emulsões de MMA e a produção de nanopartículas deste homopolímero, seguindo as etapas apresentadas na Figura 3.1.

### 4.1 Escolha de surfactante

A Tabela 4.1 dispõe a classificação dos surfactantes escolhidos de acordo com a natureza do grupo hidrofílico e a toxicidade oral em ratazanas (sendo LD50 a dose letal para matar 50 % de uma população teste) disponíveis nas fichas dos fabricantes (GUINAMA, 2014; MERCK MILLIPORE, 2019; SIGMA-ALDRICH BRASIL, 2015, 2018c, b, a, 2019). Nota-se que o estudo foi bastante abrangente porque possibilitou avaliar o desempenho de surfactantes com características e mecanismos de estabilização diferentes. A estabilização eletrostática, presente no uso de surfactantes iônicos, é dependente da repulsão compartilhada da dupla camada elétrica de cargas entre as partículas coloidais. Já a estabilização estérica, encontrada com a aplicação de surfactantes não iônicos, é promovida por meio da proteção da partícula coloidal por efeito de volume excluído causado pela adsorção de moléculas volumosas na superfície das partículas coloidais (MADKOUR *et al.*, 2019). Outro ponto distinto entre as moléculas de surfactante escolhidas é o efeito em organismos biológicos.

Tabela 4.1. Características dos surfactantes comerciais escolhidos para avaliação de estabilidade de emulsão MMA em água.

Nome	Código	Classificação	LD50 ratazana oral (mg/kg)
dodecil sulfato de sódio	SDS	aniônico	977
brometo de cetrimônio	CTAB	catiônico	410
monooleato de sorbitan 80	SP80	não iônico	39.800
polissorbato 80	TW80	não iônico	34.500
pectina de maçã	PEC	não iônico (polimérico)	5.000
Pluronic <sup>®</sup>	PLU	não iônico (polimérico)	9.380
poliacetato de vinila	PVA	não iônico (polimérico)	>20.000

A toxicidade apresentada na Tabela 4.1 mostra que as diferentes estruturas químicas dos surfactantes apresentam efeitos distintos em seres vivos. A presença de SDS é associada a modificações na permeabilidade celular e irritações de pele (CHATURVEDI; KUMAR, 2010; KUMAR *et al.*; THONGER, 2014). Já o CTAB pode desestruturar membranas plasmáticas e impactar o ciclo de energia celular, ao reduzir a síntese de ATP (SCHACHTER, 2013). Surfactantes não iônicos, por não serem eletricamente carregados, não tendem a interagir com proteínas e, por isso, apresentam irritação mínima à pele, mas relacionada à natureza da ligação química do grupo polar e da cadeia alquila (LÉMERY *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2014). De forma geral, o nível de toxicidade de um surfactante é relacionado com a concentração e o tempo de exposição. Assim, o estudo em questão foi desenhado para utilizar baixas concentrações de surfactante, procurando evitar níveis de toxicidade elevados.

Primeiramente, as emulsões criadas a partir da variação mássica de surfactante e de fase orgânica foram avaliadas conforme os perfis de desestabilização, que estão dispostos na Figura 4.1, Figura 4.2, Figura 4.3 e Figura 4.4. A análise das curvas de variação de *backscattering* permitiu acompanhar a movimentação das gotas de emulsão em relação à posição vertical e ao tempo transcorrido desde a emulsificação. Dessa forma, foi possível fazer a avaliação cinética para identificar fenômenos de desestabilização (como cremeação e clarificação) utilizando uma metodologia não destrutiva (MENGUAL *et al.*, 1999). Cabe ressaltar que, após a emulsificação, nenhum outro mecanismo de

agitação foi empregado; logo, os resultados retratam a capacidade de estabilização da emulsão em completo repouso.

A Figura 4.1 ilustra o perfil de *backscattering* para as emulsões preparadas com 1 %m/m de surfactante (em relação à fase orgânica) e 10 %m/m de MMA. As curvas são dispostas em relação ao tempo e, como não foi observada sobreposição total das curvas, nenhuma emulsão se mostrou perfeitamente estável em 30 min. Os surfactantes que obtiveram curvas mais próximas foram PLU, TW80, SP80 e PVA sendo, portanto, os melhores estabilizantes para estas condições. SDS, CTAB e PEC mostraram curvas mais isoladas, que se traduz para um deslocamento de gotas muito significativo, levando à separação de fases, que também foi detectado visualmente.

Por meio da variação local de *backscattering* consegue-se observar a presença de fenômenos gravitacionais, como clarificação e cremação em todas as combinações testadas. A clarificação é caracterizada pela diminuição de *backscattering* na região inferior (canto esquerdo do gráfico), o que sugere redução de concentração de gotas, assim clareando o local (MENGUAL *et al.*, 1999). Isso já era esperado, tendo em vista que a fração orgânica usada, o MMA, possui uma densidade menor que a da fração dispersante. Portanto, em ocasião de instabilidade, espera-se um fenômeno ascendente do MMA. Já a cremação é determinada pela flotação de gotas e conseqüente acúmulo no topo, visto pelo aumento de *backscattering* na região direita do gráfico (MENGUAL *et al.*, 1999), característica também muito encontrada em emulsões do tipo óleo/água.

A variação de *backscattering* na região mediana do gráfico indica coalescência, flocculação de gotas ou movimentação lenta das mesmas (MENGUAL *et al.*, 1999). Este fenômeno, especialmente presente no caso PEC, pode ser justificado pelo aumento de viscosidade causado pela pectina, podendo retardar a movimentação de gotas.

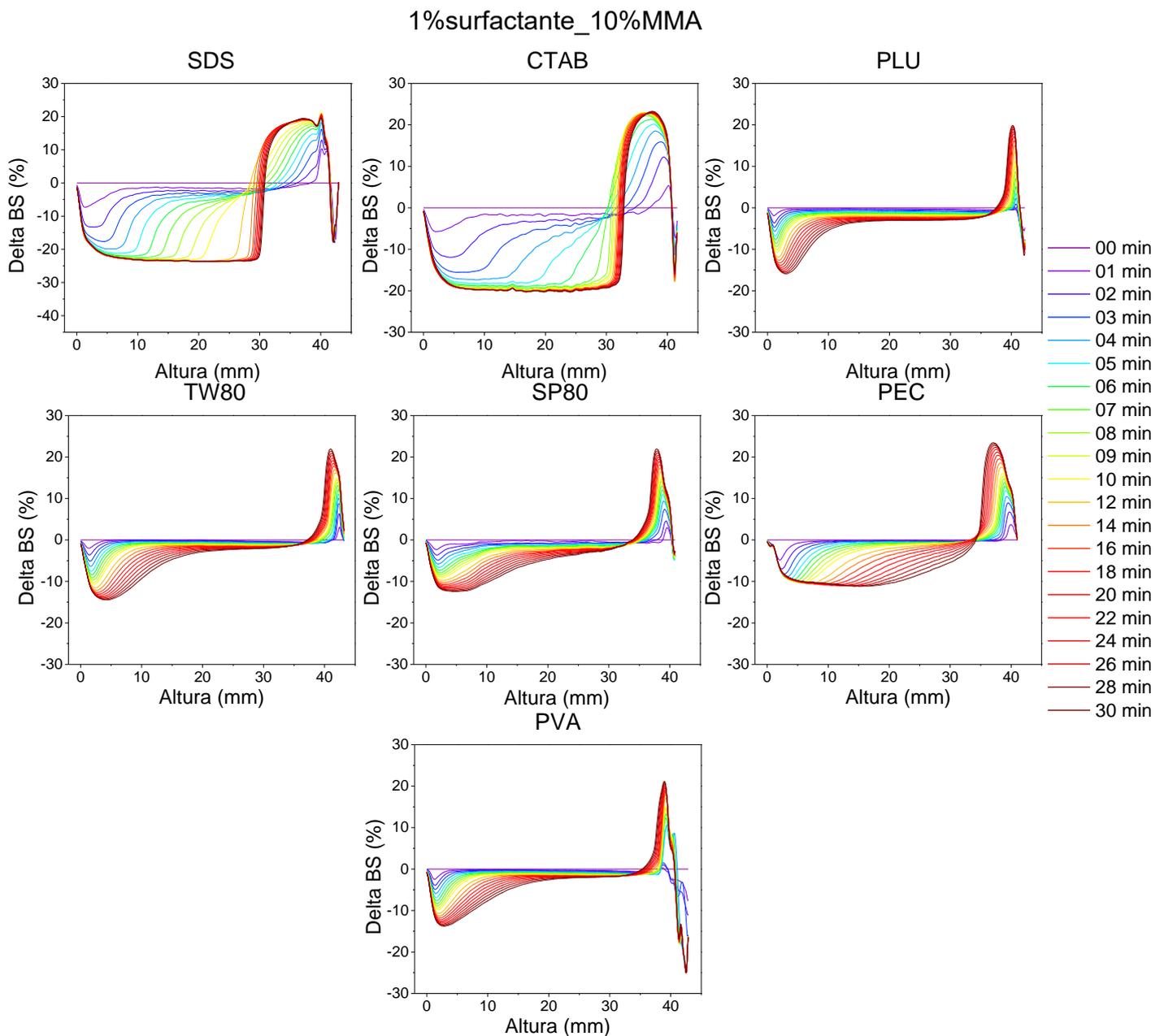


Figura 4.1. Variação de backscattering versus altura (mm) de emulsões contendo 1% m/m de surfactante e 10% m/m de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios ( $t=0$  min) até tons quentes ( $t=30$  min).

A evolução/velocidade dos fenômenos também pode ser facilmente notada nesta representação gráfica. No caso dos surfactantes SDS e CTAB, ambos os fenômenos de instabilidade aconteceram em momentos iniciais, indicado pela amplitude elevada nos extremos direito e esquerdo em curvas de tons frios (tempos iniciais), reforçando a instabilização rápida do sistema. Já para os outros surfactantes testados, a velocidade de mudança de estabilidade é mais sutil, dada a proximidade das curvas; assim, a velocidade

dos eventos não pode ser imediatamente determinada, demandando análises quantitativas mais específicas.

Ao aumentar a concentração de monômero no meio, ou seja, a quantidade de fase dispersa, o comportamento das emulsões foi modificado, conforme mostra a Figura 4.2. Novamente, são identificados os fenômenos de clarificação e cremeação em todos os ensaios. SDS e CTAB também se mostraram pouco eficientes devido à rapidez com que foi observada a separação de fases. PLU dessa vez apresentou elevada instabilidade, indicando que a concentração de surfactante usada não foi suficiente para estabilizar essa quantidade de monômero. PEC apresentou melhora de comportamento, já que houve sobreposição de curvas na região mediana de emulsão, indicando melhor emulsificação. Entretanto, ainda foi observada uma separação de fase. Neste grupo de teste, TW80, SP80 e PVA foram considerados os melhores estabilizantes por apresentarem os fenômenos de cremeação e clarificação localizados em faixas estreitas de altura, criando uma região mediana mais estável. Dessa maneira, a inserção de mais monômero pareceu auxiliar a estabilidade.

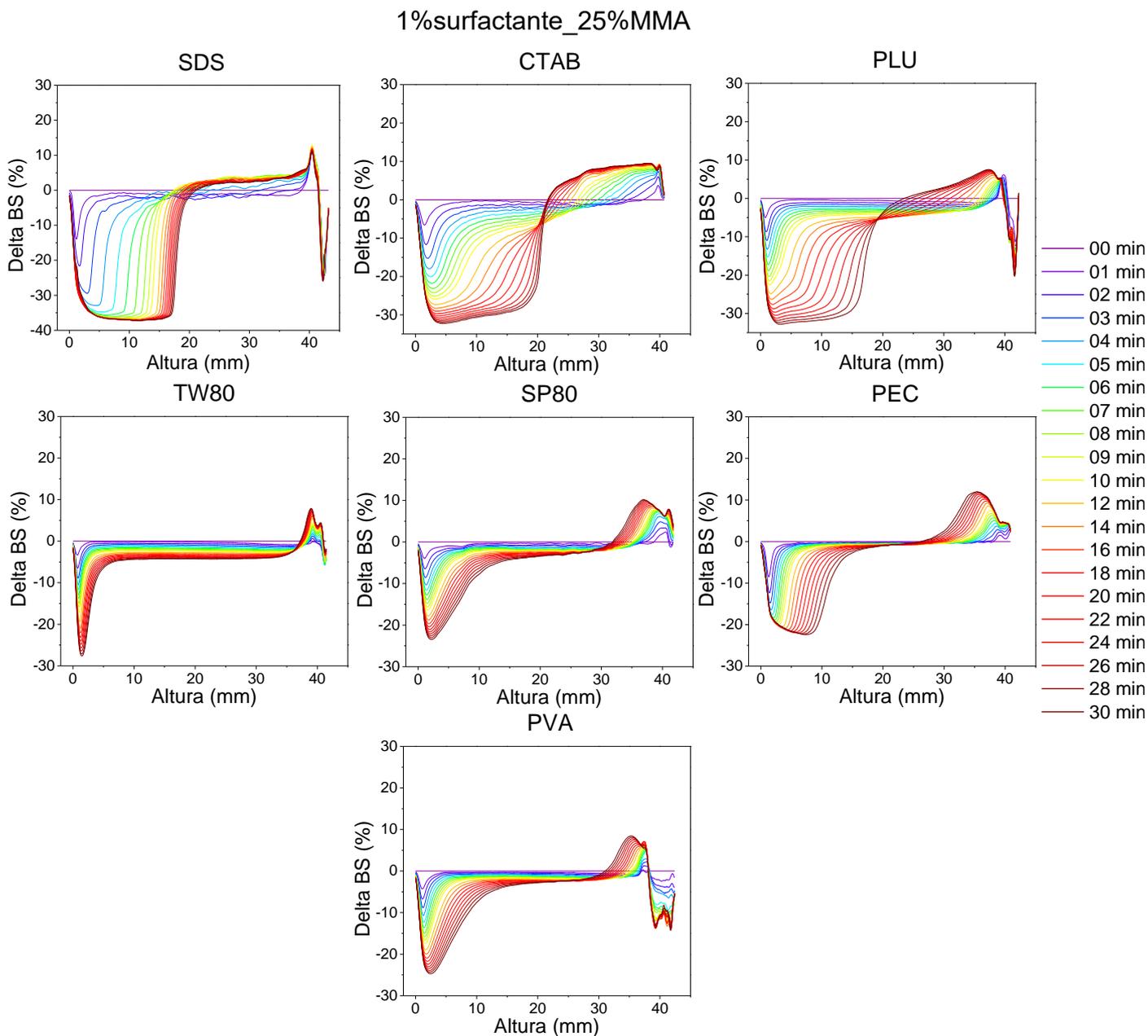


Figura 4.2. Variação de *backscattering* versus altura (mm) de emulsões contendo 1%*m/m* de surfactante e 25%*m/m* de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios ( $t=0$  min) até tons quentes ( $t=30$  min).

A Figura 4.3 mostra os perfis obtidos quando a concentração do surfactante foi aumentada para 5 %*m/m* e a proporção de MMA foi reduzida (para 10 %*m/m*). SP 80, TW80 e PVA seguiram como os melhores tensoativos por apresentarem melhores sobreposições de curva. Entre eles, o TW80 se destaca pela cremação e clarificação pouco expressivas e espacialmente restritas, e pela justaposição das curvas de *backscattering* em grande parte da emulsão.

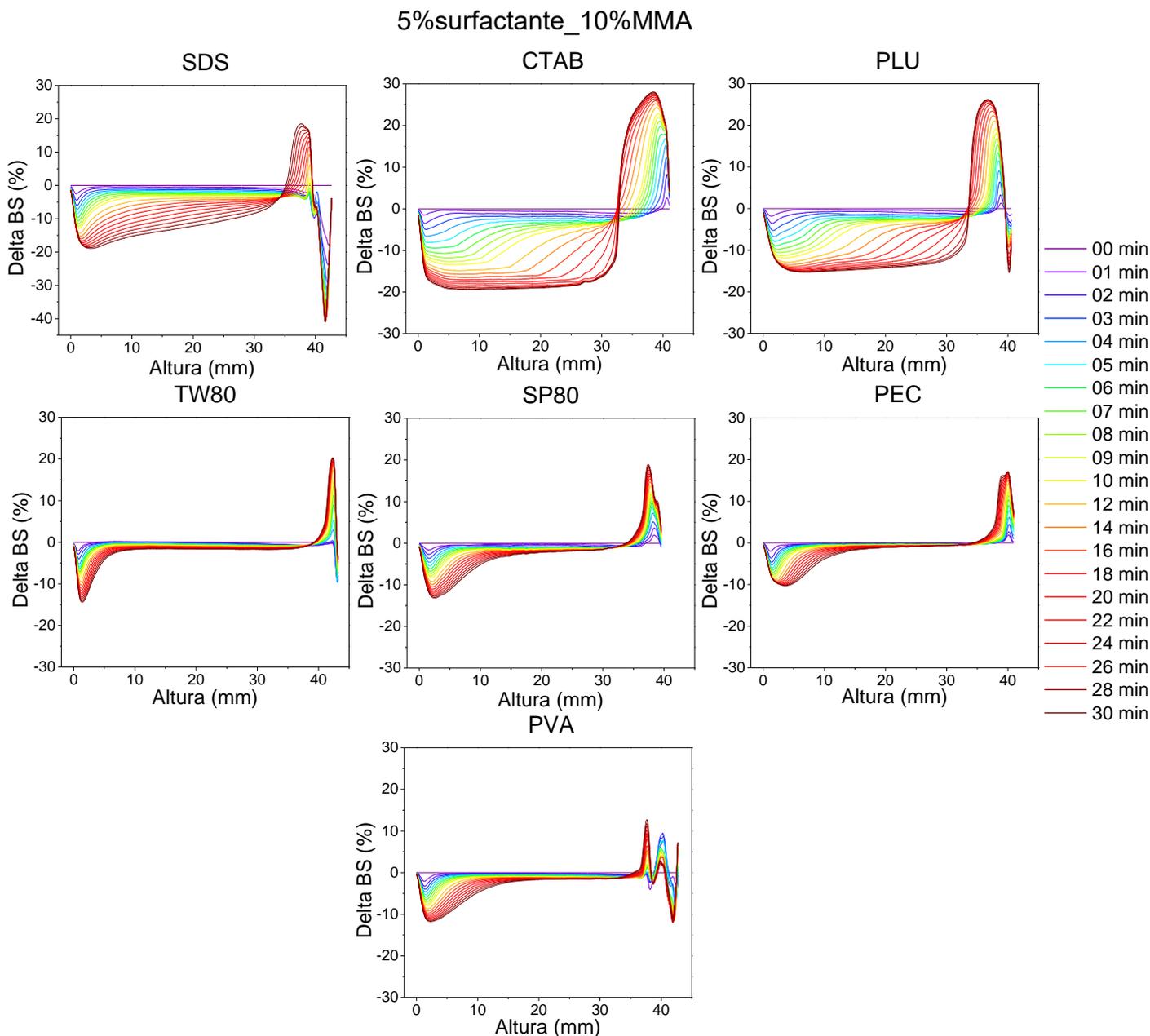


Figura 4.3. Variação de backscattering versus altura (mm) de emulsões contendo 5%*m/m* de surfactante e 10%*m/m* de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios ( $t=0$  min) até tons quentes ( $t=30$  min).

Quando se compara a Figura 4.1 com a Figura 4.3, pode-se avaliar o efeito do acréscimo mássico de surfactante. De forma geral, o aumento da razão surfactante/fração orgânica mostrou-se vantajoso, verificado pela maior proximidade das curvas. Para o SDS e a PEC, este efeito é especialmente significativo. Já o CTAB continuou apresentando os piores resultados de estabilidade com separação absoluta de fases também confirmada visualmente. Entretanto, a separação de fases, evidenciada pela

rápida queda das curvas de *backscattering*, foi mais lenta em comparação com a condição 1%CTAB\_10%MMA. Isso indicaria a necessidade de aumento da concentração de surfactante para melhorar a estabilidade no sistema, mas existem exceções.

O PVA mostrou melhora de comportamento em relação à condição 1%PVA\_25%MMA (Figura 4.2), já que a magnitude da variação de *backscattering* foi menor, mas muito semelhante à obtida em 1%PVA\_10%MMA. Isso indicaria que mais do que a concentração no meio, uma fração orgânica mais baixa seria mais importante para garantir a estabilidade do sistema. Esse fato também foi observado para o PLU.

Quando se comparam os resultados para 1%PLU\_10%MMA com os obtidos com aumento da fração orgânica (1%PLU\_25%MMA) e de surfactante (5%PLU\_10%MMA), não foram observadas melhorias significativas na estabilidade do sistema. Apesar de claramente evidenciar os fenômenos de cremeação e clarificação, a condição 1%PLU\_10%MMA ainda foi a melhor composição testada desse surfactante. Assim, os resultados dos perfis mostram que não há uma regra geral a ser observada para todos os surfactantes estudados.

A Figura 4.4 mostra o último caso explorado: maior concentração de surfactante (5 %m/m) com maior teor de fração orgânica (25 %m/m). Uma vez mais, os surfactantes iônicos apresentaram os piores resultados. Isto evidencia a tendência de que, para melhorar a estabilização, é necessário o aumento da concentração destes surfactantes no meio, de maneira que a adição precisa ser ainda maior com o aumento de fração orgânica.

PLU também repetiu o desempenho ruim. A separação de fases foi facilmente observada pela sobreposição de curvas de tempos finais (tons quentes), evidenciando uma importante limitação deste surfactante. Assim, talvez este surfactante não seja adequado para estabilizar este tipo de emulsão.

O perfil apresentado pela PEC mostrou muitos ruídos de leitura, que foram associados à alta viscosidade do sistema. A PEC, por ser uma proteína higroscópica, possui grande capacidade de inchamento, resultando na formação de géis e aumento de viscosidade da emulsão. Ao analisar todos os perfis de PEC, a conformação 5%PEC\_25%MMA apresentou a melhor estabilidade, tendo em vista a baixa intensidade de variação local do sinal de *backscattering* em relação aos ensaios anteriores. Entretanto, a alta viscosidade pode ser uma propriedade indesejável para algumas aplicações de emulsões líquidas.

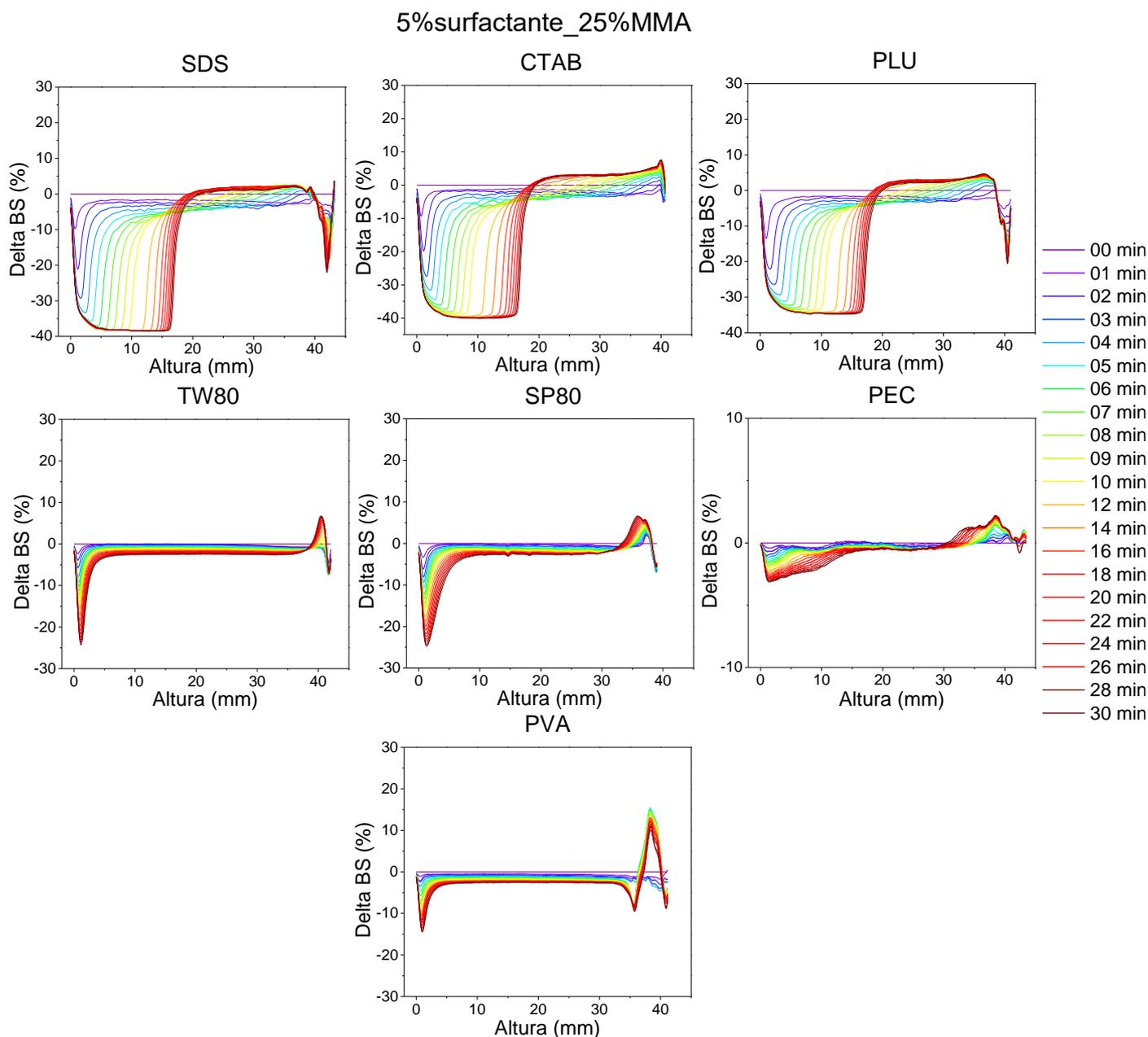


Figura 4.4. Variação de *backscattering* versus altura (mm) de emulsões contendo 5%*m/m* de surfactante e 25%*m/m* de MMA. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios ( $t=0$  min) até tons quentes ( $t=30$  min).

Novamente, os melhores estabilizantes para esta condição foram SP80, TW80 e PVA. Os dois primeiros apresentaram tendências similares: quando há maior teor orgânico há predomínio do fenômeno de clarificação. Já a cremeação torna-se mais expressiva em 10 %*m/m* de MMA. A melhor sobreposição de curvas (melhor estabilidade) se deu em concentrações maiores de surfactante, podendo estar associado ao mecanismo de estabilização estérica: maior concentração de surfactante conseguiria

cobrir melhor as gotas orgânicas. Este efeito é mais bem representado na Figura 4.5, onde as curvas de variação do sinal de *backscattering* em diferentes razões são comparadas lado a lado, utilizando o surfactante Tween80 como um exemplo.

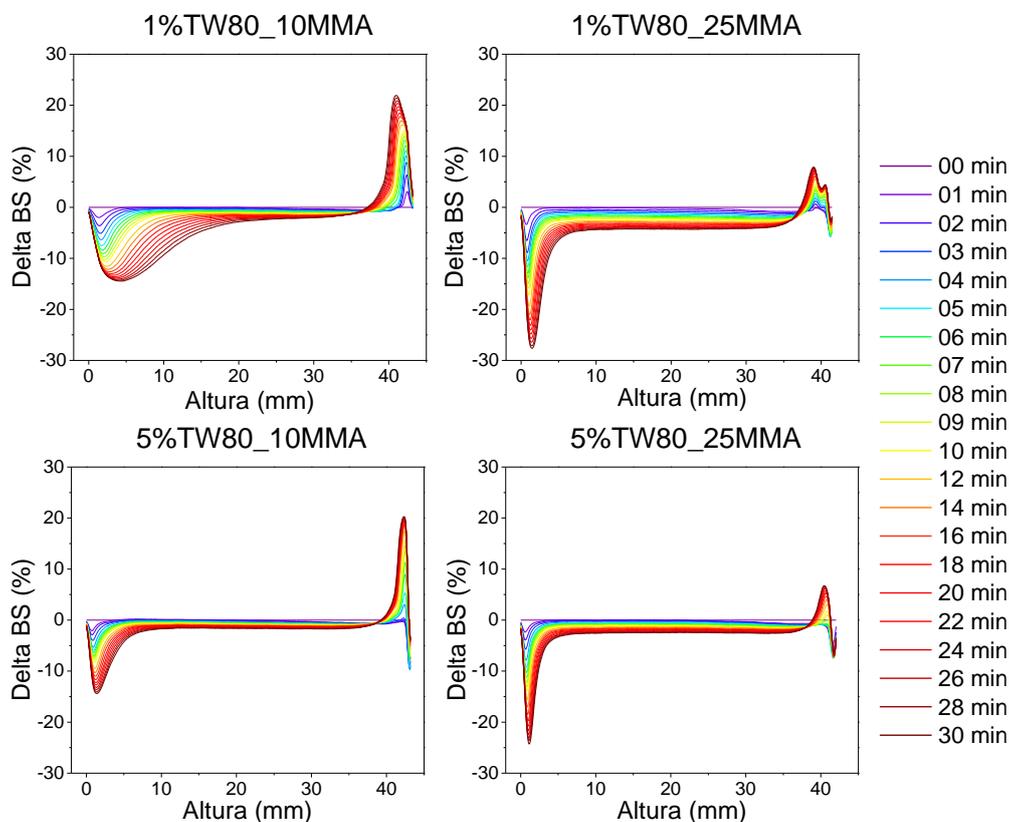


Figura 4.5. Efeito entre razão de surfactante e massa de monômero, usando o surfactante Tween80 como exemplo.

Por fim, o PVA mostrou comportamentos muito semelhantes para os dois ensaios contendo 5 %m/m de surfactante. Foi visível a melhora de estabilização quando a concentração de PVA no meio foi aumentada. Como já explicitado anteriormente, isto também pode estar associado ao melhor recobrimento estérico das gotas por aumento de concentração no meio. Ao comparar a intensidade da variação do sinal de *backscattering* das emulsões 5%PVA, notou-se que a estabilidade foi melhor quando o teor orgânico foi maior. Uma hipótese seria de que, por se tratar de um polímero hidrossolúvel, pode ser esperada a sua presença na região *bulk* aquosa. A redução de fração aquosa pode ter auxiliado o posicionamento específico do PVA nas interfaces, melhorando a estabilidade da emulsão.

Os perfis de variação de sinais de *backscattering* possibilitaram observar o comportamento das emulsões com o passar do tempo, identificando a presença e a intensidade, assim como inferir a velocidade dos fenômenos de separação. Além desta avaliação qualitativa, o *software* do Turbiscan<sup>®</sup> permite calcular alguns parâmetros que também podem ser utilizados para avaliar a qualidade da estabilidade formada. A Figura 4.6 apresenta a representação gráfica dos valores de TSI e das taxas de clarificação e cremeação de cada ensaio realizado. Os valores brutos calculados estão apresentados no Apêndice 1.

O TSI é um indicativo de instabilidade do sistema, calculado automaticamente pelo *software*. Assim, quanto maior o valor do TSI, mais instável é o sistema. Valores de TSI de até 0,5 são classificados como os melhores estágios de estabilidade, já que não há detecção de instabilidade e a amostra continua muito estável. De 0,5 a 1, já são detectados baixos sinais de desestabilização, como migração ou variação de tamanho, mas a amostra ainda é visivelmente estável. TSI entre 1 e 3 são associados a estágios iniciais de desestabilização, com pouca ou nenhuma visualização. Valores de 3 a 10 indicam fenômenos de instabilidade mais expressivos como sedimentação, cremeação e até pequenas separações de fases, que podem eventualmente ser detectadas visualmente. Já quando o TSI apresenta valores acima de 10, variações importantes e instabilidade já são detectadas, sendo quase certamente visíveis. (FORMULACTION, 2019). Assim, o valor de TSI pode ser utilizado como um parâmetro quantitativo de avaliação de qualidade de emulsões.

Outro cálculo realizado foi o de determinação das taxas de cremeação e de clarificação, ambas baseadas na velocidade de variação dos valores de *backscattering* nas alturas de ocorrência de cada fenômeno. Sabendo-se que, quanto maiores são as taxas de cremeação e clarificação, mais rápidos são os fenômenos de instabilização, essas taxas indicam a velocidade da perda de estabilidade nos sistemas investigados.

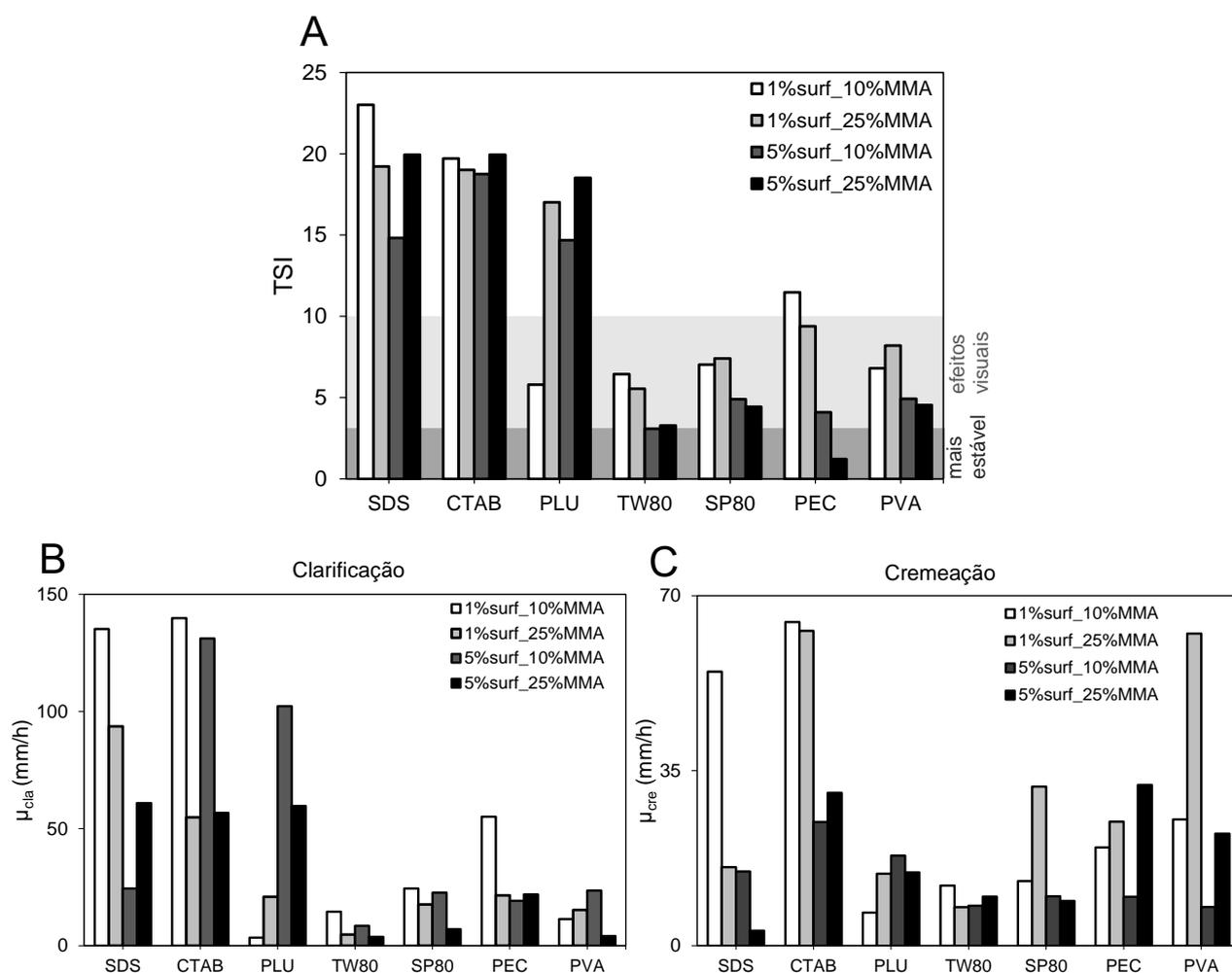


Figura 4.6. Índices quantitativos para avaliação de estabilidade de emulsões MMA em água com diferentes surfactantes: A- TSI, B- taxa média de clarificação e C – taxa média de cremeação.

Observando os valores de TSI e das taxas de cremeação e clarificação, pode-se detectar instabilidade expressiva para os surfactantes iônicos SDS e CTAB. Em ambos os casos, os valores de TSI foram próximos de 20, muito acima dos limites de estabilidade desejáveis. Além disso, as taxas de separação também foram altas, chegando a valores próximos de 100 mm/h. Estes resultados, somados às conclusões obtidas das análises de perfis de *backscattering*, suportam a ideia de que SDS e CTAB levam à rápida desestabilização das emulsões de MMA de água.

Para o PLU, apenas a condição 1%PLU\_10MMA mostrou bons parâmetros de estabilidade, com TSI e velocidades de migração baixos (menores que 10). Isto corroborou as análises anteriores, das quais o perfil para 1%PLU\_10MMA apresentou

melhor sobreposição de curvas. Assim, para usar PLU como estabilizante, deve-se restringir a composição da emulsão, o que pode não ser muito desejável.

O surfactante TW80 apresentou valores de TSI e de velocidade de clarificação e cremeação reduzidos para todas as condições testadas, sugerindo boa capacidade de estabilização de emulsões de MMA em água. O menor valor de TSI, logo mais estável, foi observado para os ensaios com 25 %m/m MMA. Em especial para a composição com 5 %m/m também foram obtidas baixas velocidades de separação, portanto a melhor condição de estabilidade entre os surfactantes testados.

SP80 também mostrou bons resultados de estabilidade. Assim como no caso de TW80, os melhores resultados foram associados a composições com maiores teores de MMA, sendo a melhor condição com maior concentração de surfactante. Os resultados quantitativos corroboraram o que já foi analisado no perfil de dispersão de luz.

Os resultados de PEC mostraram redução dos valores de TSI com o aumento mássico do surfactante. Conforme explicado anteriormente, o aumento de viscosidade pode ter contribuído para esse resultado, já que diminui a movimentação de gotas orgânicas dispersas, reduzindo a intensidade dos fenômenos de instabilidade de cremeação e clarificação. Por isso, também foi possível observar a redução das taxas de cremeação e clarificação para essas condições. Entretanto, cabe ressaltar que a alta viscosidade da fase dispersa pode limitar a aplicação da emulsão. No caso deste estudo, viscosidade elevada não seria indicada para a aplicação biomédica de interesse.

O PVA apresentou resultados intrigantes e, à primeira vista, inconsistentes. Com o aumento de surfactante no meio, os valores de TSI foram reduzidos, a uma faixa de estabilidade considerada boa. Entretanto, em 10 %m/m MMA foi observada uma mudança quanto ao fenômeno de instabilidade mais presente. De acordo com os cálculos, a clarificação tornou-se mais expressiva que os efeitos de cremeação, o que poderia indicar menor cobertura de gotas emulsionadas, impulsionando-as para cima por conta da diferença de densidade do MMA e da água. Apesar desta diferença, a condição 5%PVA\_25%MMA ainda se mostrou a mais estável.

De modo geral, os ensaios de estabilidade permitiram conclusões interessantes a respeito dos surfactantes escolhidos. Embora em graus de intensidade distintos, todos os tensoativos apresentaram principalmente fenômenos de instabilidade (cremeação e clarificação) considerados reversíveis (MENGUAL *et al.*, 1999). Isto é certamente muito

positivo, já que demonstra a grande capacidade de criar uma emulsão estável com o sistema de interesse (MMA e água). Entretanto, é notável o desempenho superior de alguns tensoativos neste sistema.

Tendo em vista os dados expostos, pode-se constatar que os surfactantes TW80 e SP80 apresentaram desempenhos mais consistentes e estáveis, tornando-se os melhores surfactantes entre os testados nas condições avaliadas. Esta conclusão é muito vantajosa, já que o TW80 é uma substância de uso aprovado pelo órgão FDA (*Food and Drug Administration*) e a literatura comumente associa o seu uso ao aumento de biocompatibilidade de materiais, extensão de tempo circulatório em organismo vivo e liberação controlada de ativos (KAUR; MEHTA, 2017). Com certeza, essas propriedades são muito úteis para o desenvolvimento de nanomateriais com fármacos encapsulados, que constitui o objetivo geral deste trabalho. Além disso, é até certo ponto surpreendente observar que os surfactantes SDS e CTAB, amplamente usados para estabilizar reações de polimerização em emulsão e miniemulsão, tenham apresentado os piores resultados entre os surfactantes testados, sugerindo (como de fato confirmado nas próximas seções) que as estabilizações de emulsões de monômeros e látexes poliméricos constituem fenômenos distintos, o que tem sido discutido com pouca profundidade na literatura.

#### **4.2 Efeito do número HLB**

A seção anterior evidenciou que o tipo e a concentração de surfactante exercem grande influência na estabilidade de emulsões de MMA em água. TW80 e SP80 exibiram os resultados mais consistentes nas faixas específicas testadas. Entretanto, é necessário definir a concentração ideal do surfactante para que a sua ação no sistema seja efetiva. Uma estratégia para definição de proporção mássica é a definição do HLB requerido pela emulsão (GRIFFIN, 1949).

Nesta seção, emulsões de MMA em água com diferentes combinações de SP80 e TW80 foram preparadas para criar faixas de valores de HLB diferentes e permitir a avaliação de estabilidade para cada uma. A proporção mássica da mistura de surfactantes também foi variada em 1%, 3% e 5% m/m em relação à fração orgânica com o objetivo de estudar o impacto da quantidade de surfactantes na estabilização da emulsão final. A fração orgânica foi mantida em 25% (em relação a massa total), já que uma maior proporção de MMA aumentaria o rendimento de nanopartículas sintetizadas. Neste caso,

como os melhores resultados da etapa anterior foram obtidos com os surfactantes SP80 e TW80, o estudo do efeito do HLB sobre a estabilidade pode ser diretamente implementado nas reações de polimerização.

De forma análoga ao ensaio anterior, a estabilidade foi avaliada de acordo com o perfil de dispersão de luz e com algumas variáveis quantitativas calculadas posteriormente. A Figura 4.7 apresenta os perfis de variação de *backscattering* obtidos para as emulsões de MMA em água sintetizadas com 1 %m/m. Cabe ressaltar que as combinações de surfactantes permitiram avaliar também o comportamento da emulsão com uso de SP80 puro (HLB 4,3) e de TW80 puro (HLB 15).

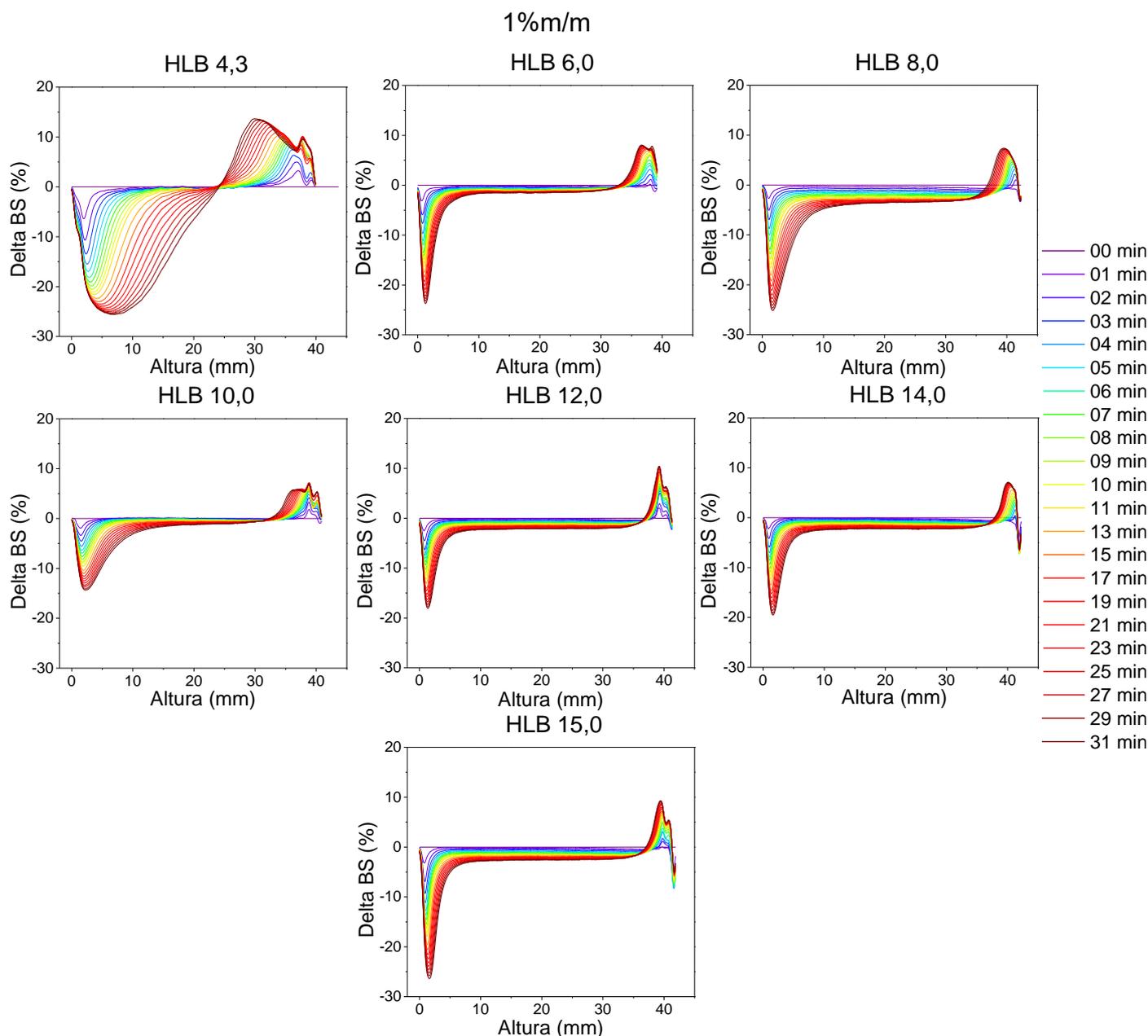


Figura 4.7. Perfil de variação de *backscattering* versus altura (mm) de emulsões contendo 1% m/m de surfactante e variando HLB. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios ( $t=0$  min) até tons quentes ( $t=30$  min). Adaptado de MANGIA *et al* (2022).

Ao analisar a Figura 4.7, observou-se claramente o comportamento diferenciado da emulsão em 1%\_HLB4,3 em relação às demais. Desde os primeiros minutos de análise, a emulsão se desestabilizou significativamente sustentada ao longo de todo período de análise, como pode ser observado pela grande variação de *backscattering* negativa no fundo da cubeta (clarificação) e positiva em alturas superiores (cremeação). Conclui-se que este HLB não seria adequado para esta emulsão. Isto já era esperado, visto

que o HLB baixo de 4,3, constituído apenas por SP80, é comumente aplicado em emulsões do tipo água em óleo (ICI AMERICAS INC, 1984), o que não é o caso pretendido.

Contudo, com o avanço para maiores valores de HLB, as curvas de variação de *backscattering* foram se sobrepondo, indicando uma melhora de estabilidade. Ainda assim, os fenômenos de clarificação e cremeação em faixas de altura estreitas (5 mm) foram observados, evidenciando que a estabilização ainda não era completa. Destaca-se ainda que o comportamento da condição 1%\_HLB15, TW80 puro, parece ser menos estável que as condições com mistura de surfactantes. Isto pode ser evidenciado pela amplitude de variação de leitura do sinal de *backscattering*, que foi de cerca de -25% para 1%\_HLB15, -15% para 1%\_HLB 10 e -20% para 1%\_HLB 12 e 1%\_HLB 14.

Dessa forma, pode-se inferir que a combinação de dois surfactantes é benéfica para a estabilidade. Este fato, inclusive, já foi corroborado pela literatura para outras emulsões (LV *et al.*, 2014). Entretanto, conforme observado anteriormente, a quantidade de surfactante no sistema também exerce forte influência sobre a estabilização. Por isso, foi pertinente aumentar a proporção mássica de surfactantes, buscando observar se ocorreriam melhorias de estabilidade, a fim de se determinar o valor de HLB mais adequado para o sistema estudado.

A Figura 4.8 exhibe os comportamentos das emulsões de HLB diferentes com 3 %m/m de surfactantes. Novamente, conclui-se que o perfil obtido pela emulsão 3%\_HLB4,3 apresentou desempenho inferior em relação aos das demais composições estudadas. Grandes variações das curvas de leitura foram observadas e perduraram ao longo do tempo e altura da cubeta, revelando que grande parte do sistema sofre desestabilização. Entretanto, quando se comparam os perfis obtidos com as emulsões 1%\_HLB4,3 e 3%\_HLB4,3, pode-se observar uma melhora de estabilidade significativa, evidenciada pela presença de curvas próximas nas regiões entre 20 e 30 mm, antes ausentes. O mesmo também foi observado para emulsões com TW80 puro; ou seja, HLB15. A emulsão 3%\_HLB15 também exibiu grande influência do fenômeno de clarificação (tido pela variação do sinal de *backscattering* de -25%) como em 1%\_HLB15, mas o uso de mais surfactante foi benéfico para redução da presença de cremeação, como mostrado pela redução da variação do sinal de *backscattering* em faixas superiores de altura (de 10% para 5%). Assim, confirmou-se a tendência de que o

aumento da concentração mássica de surfactante na faixa avaliada pode ser favorável para a estabilização da emulsão.

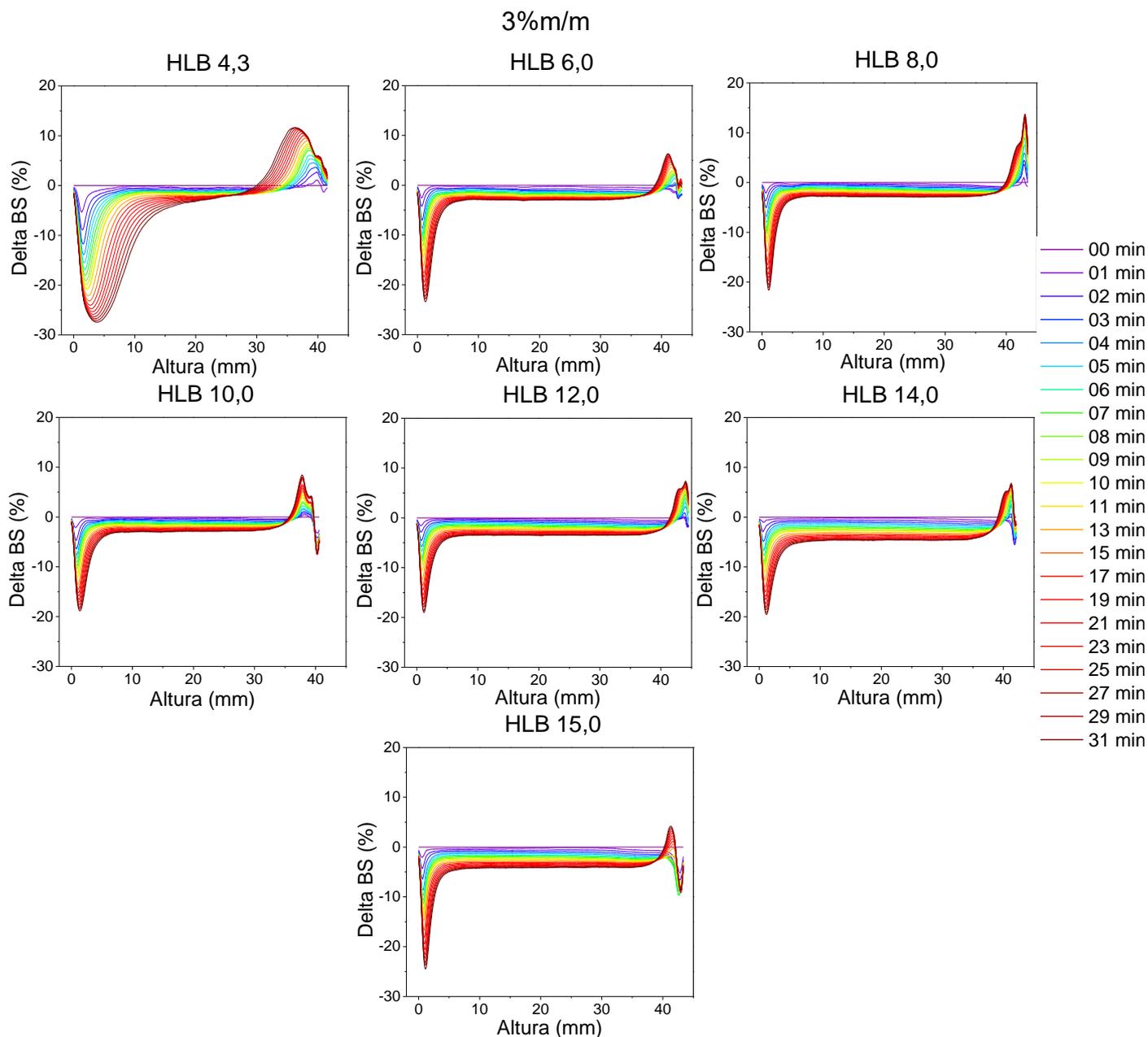


Figura 4.8. Perfil de variação de *backscattering* versus altura (mm) de emulsões contendo 3% m/m de surfactante e variando HLB. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios ( $t=0$  min) até tons quentes ( $t=30$  min). Adaptado de MANGIA *et al* (2022).

O aumento do valor de HLB para o caso com 3 %m/m de surfactantes também ratificou a conclusão anterior em relação à combinação de surfactantes. Ao confrontar os perfis obtidos, a melhor sobreposição de curvas foi associada a emulsões de HLB medianos. Apesar da participação dos fenômenos de clarificação (majoritariamente) e de

cremeação, os experimentos 3%\_HLB6 e 3%\_HLB8 revelaram curvas de variação de sinal de *backscattering* mais próximas ao longo de uma faixa mais extensa de altura (entre 5 e 35 mm). Isto indica que a variação espacial e temporal das gotas de MMA dispersas foi pequena, de maneira que as emulsões são mais estáveis. Logo, uma maior contribuição mássica dos dois tipos de surfactantes pode constituir a melhor estratégia para estabilizar emulsões de MMA em água.

Por fim, emulsões de MMA em água foram criadas com 5 %m/m de surfactantes e seus perfis de dispersão estão dispostos na Figura 4.9. Conforme já observado anteriormente, o aumento de massa de surfactante resultou em melhorias na estabilização da emulsão, tendo em vista a maior proximidade das curvas temporais e estreitamento da variação do sinal de *backscattering*.

A condição 5%\_HLB4,3 exibiu o melhor resultado entre as três condições testadas para SP80 puro. Isto foi evidenciado pelo estreitamento horizontal das curvas nas regiões associadas aos fenômenos de clarificação e cremeação. Além disso, há melhor aproximação das leituras na região mediana do gráfico, indicando baixa mobilidade de gotas. Para TW80, foram obtidas conclusões semelhantes. Entretanto, apesar da melhora significativa, o uso dos surfactantes isolados não permitiu obtenção de desempenho superior aos obtidos com a utilização das misturas.

Os perfis da Figura 4.9 mostraram comportamentos muito semelhantes, com tendência a estabilizações melhores em valores medianos de HLB. Este fato pode ser melhor observado com auxílio da variação do sinal de *backscattering* na ordem de -25% na região esquerda do gráfico e de 5% na região direita, para as amostras 5%\_HLB6, 5%\_HLB8 e 5%\_HLB10.

Mesmo com o aumento da concentração mássica, os fenômenos de clarificação e cremeação ainda estiveram presentes, independentemente do valor de HLB testado. Contudo, a conclusão geral permaneceu a mesma: a combinação de surfactantes permitiu sempre obter melhores desempenhos. Esta faixa ótima de HLB encontrada está de acordo com a relatada pela literatura como adequada para emulsões do tipo óleo em água (HLB de 8 a 12) (ICI AMERICAS INC, 1984).

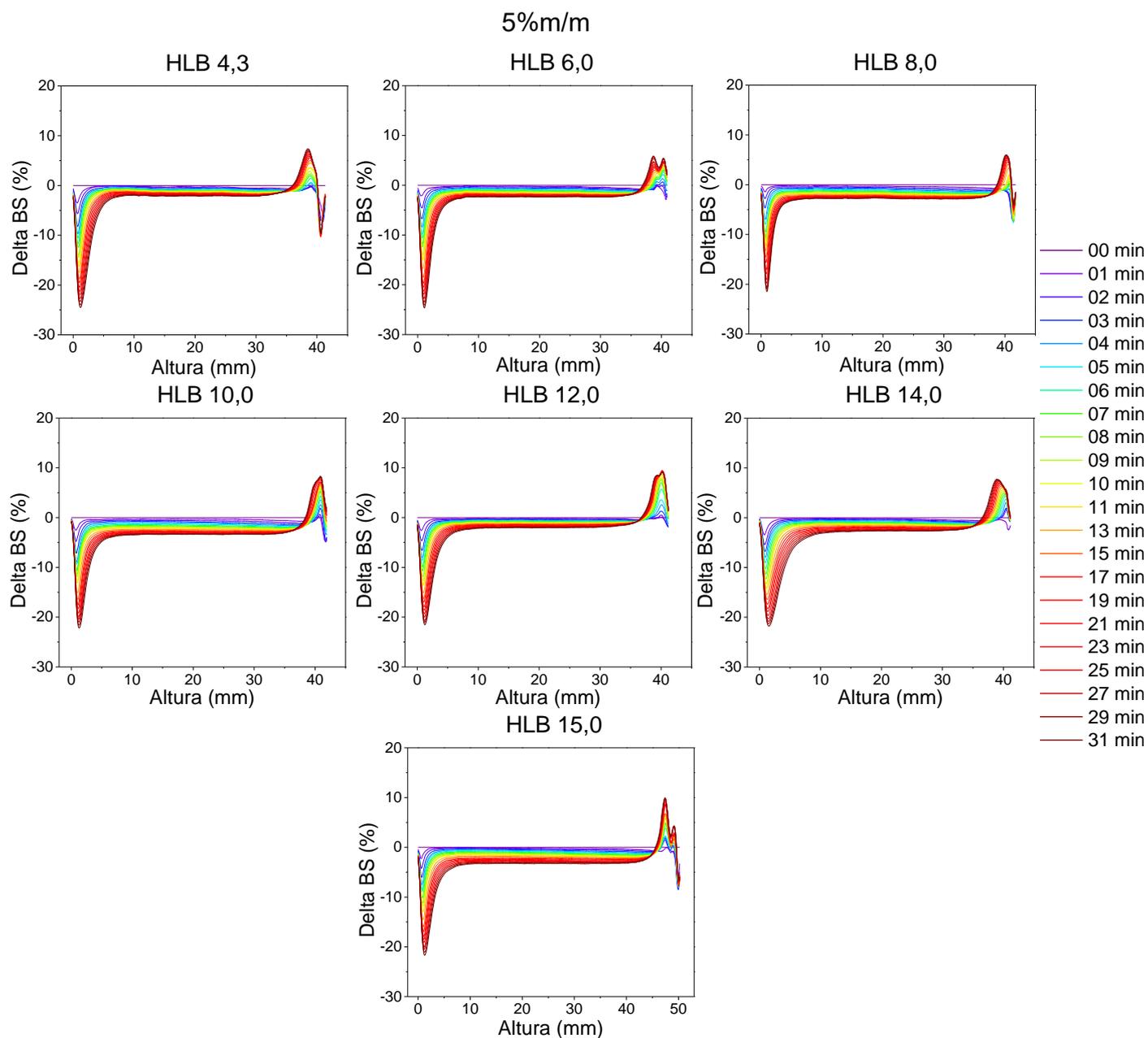


Figura 4.9. Perfil de variação de *backscattering* versus altura (mm) de emulsões contendo 5% m/m de surfactante e variando HLB. As curvas estão dispostas em intervalo de tempo crescentes de tons frios (t=0 min) até tons quentes (t=30 min). Adaptado de MANGIA *et al* (2022).

A determinação de alguns parâmetros quantitativos foi também muito relevante para a análise de estabilidade. A Figura 4.10 mostra a representação gráfica dos valores de TSI,  $\mu_{cla}$  e  $\mu_{cre}$  e do índice de clarificação (IC). Os respectivos valores brutos podem ser encontrados no Apêndice 2. Como o IC foi estimado após um período de 24 horas, foi possível também obter uma avaliação a longo prazo, sendo esta também uma maneira de inferir a qualidade da emulsão.

Ao analisar os valores dos parâmetros obtidos para o experimento HLB4,30, verificou-se que o aumento de massa de surfactante gerou melhorias na estabilidade. O TSI reduziu de um valor considerado instável (acima de 10) para 3,55, tido como estável. As velocidades de cremeação e clarificação, assim como o IC, também diminuíram consideravelmente, indicando que a emulsão levou mais tempo para desestabilizar. Esses resultados corroboraram o que foi observado visualmente nos perfis apresentados anteriormente. Para valores medianos de HLB, 6, 8 e 10, também pode-se observar uma melhor estabilidade ao aumentar o percentual mássico de surfactante. Cabe ressaltar que os desempenhos para 3 %m/m e 5 %m/m foram muito semelhantes, com valores de TSI estáveis (abaixo de 5), baixas taxas de migração, clarificação e cremeação (próximas a 10 mm/h) e IC reduzido.

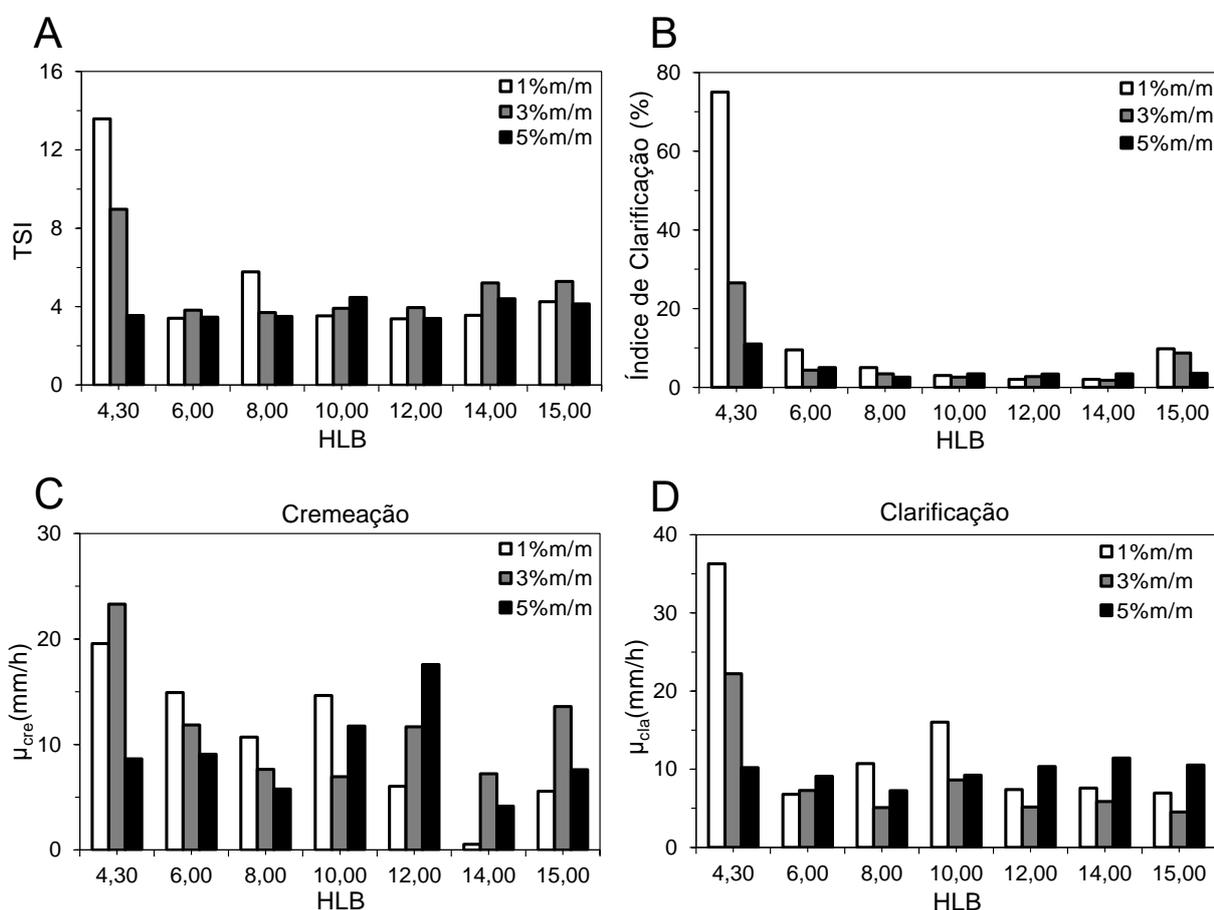


Figura 4.10. Índices quantitativos para avaliação de estabilidade de emulsões MMA em água com diferentes valores de HLB: A- TSI, B- índice de clarificação, C- taxa média de cremeação e D – taxa média de clarificação (adaptado de MANGIA *et al.*, 2022).

Já para valores elevados de HLB, como HLB 12 e 14, foi observado que o aumento da concentração de surfactantes provocou um pequeno aumento de

instabilização, que foi detectado no cálculo das taxas de migração (de 7 para 11 mm/h). Apesar disso, as emulsões não foram consideradas instáveis, já que os valores de TSI e IC se mantiveram abaixo de 5, indicando que ocorreu o início de perda de estabilidade, mas sem detecção visual.

Os resultados calculados para HLB 15 confirmam que o uso de TW80 puro não é indicado para estabilização de emulsões de MMA em água nessas condições. Foram identificados sinais de desestabilização pelas taxas de migração, que foram superiores em comparação aos valores obtidos nas outras composições testadas. Entretanto, o cálculo de TSI e IC permitiram inferir que as emulsões eram visualmente estáveis.

Assim, com base na análise das Figura 4.7 a Figura 4.10, tornou-se evidente que a combinação de SP80 e TW80 é conveniente para obter emulsões com características mais estáveis. Além disso, notou-se que, dependendo da composição mássica do meio, uma faixa de HLB específica seria mais indicada para estabilização da emulsão líquida. É importante ressaltar que esse achado é bastante original e permite especular que análises similares podem ser feitas para otimizar a composição de misturas surfactantes usadas para estabilizar outros sistemas de emulsão.

A estabilidade de uma reação em miniemulsão não é trivial, compreendendo um fenômeno complexo, já que o sistema parte inicialmente de uma emulsão líquida para produzir uma dispersão de sólido em líquido. Com o intuito de apresentar um estudo metucioso e criterioso, visando estudar todas as possibilidades exploradas, optou-se por realizar ensaios de polimerização em miniemulsão com as duas melhores combinações para cada proporção mássica de surfactante testada. Dessa forma, foi possível avaliar o desempenho da mistura de surfactantes não iônicos, tidos como não tóxicos, para a estabilização do látex polimérico final.

### **4.3 Produção de nanopartículas poliméricas de PMMA por polimerização em miniemulsão**

O item anterior permitiu indicar as melhores concentrações dos surfactantes não iônicos de acordo com o percentual mássico testado para cada condição. Entretanto, a melhor estabilidade de emulsão líquido-líquido pode, ainda assim, não resultar em uma suspensão sólido-líquido estável, como o produto obtido na polimerização (látex). Dessa forma, optou-se por realizar ensaios em reação de homopolimerização para averiguar o

comportamento dos surfactantes para a obtenção de látexes poliméricos homogêneos e estáveis.

O SDS tem sido especialmente explorado como surfactante único em estudos de polimerização em miniemulsão, incluindo homopolimerização de MMA, para a produção de látexes nanométricos (FONSECA *et al.*, 2013; HECHT *et al.*, 2011, 2013; LANDFESTER *et al.*, 1999b; PEIXOTO *et al.*, 2016; WAY *et al.*, 2019). Entretanto, há evidências que a combinação de SDS com surfactantes não iônicos contribui para redução de diâmetro de gota e aumento de estabilidade de emulsões de óleo em água (XIN *et al.*, 2013). Por isso, neste trabalho também foi testada a incorporação de SDS, juntamente com os surfactantes não iônicos. Apenas uma pequena porcentagem mássica do surfactante SDS foi utilizada na melhor condição de HLB de cada caso, a fim de estudar o efeito de combinação de surfactantes na síntese de nanopartículas de PMMA por miniemulsão.

As trajetórias das conversões de monômero nas reações de polimerização estão dispostas na Figura 4.11. Como comparativos foram adotadas as reações conduzidas com TW80 puro (HLB15) e com SDS puro (5 %m/m). Este último foi escolhido levando em consideração que as nanopartículas sintetizadas com esse surfactante apresentaram certos atributos desejados (conversão rápida, diâmetro de partícula menor que 100 nm e alta estabilidade de látex) (MANGIA *et al.*, 2021).

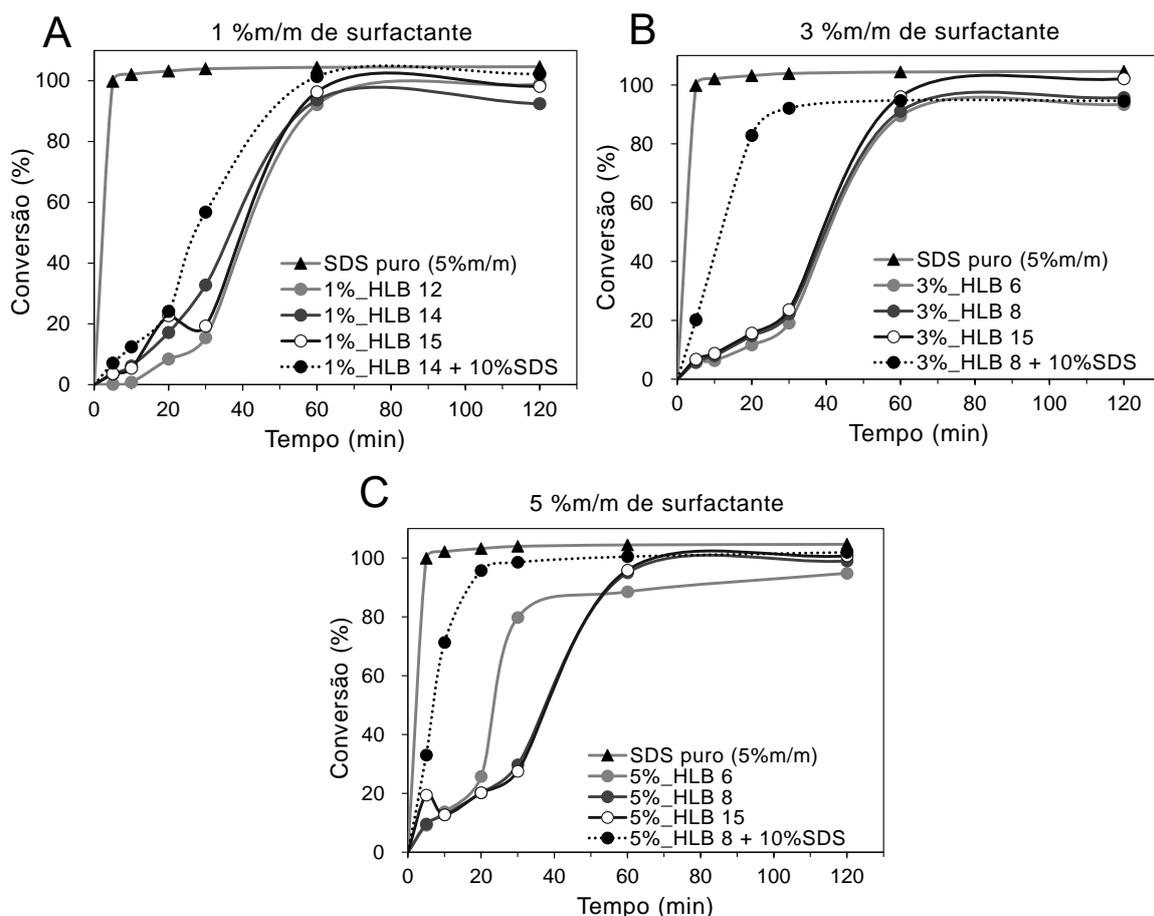


Figura 4.11. Trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações em miniemulsão conduzidas com diferentes proporções mássicas de surfactante e variados valores de HLB, adaptado de MANGIA *et al* (2022). O padrão comparativo "SDS puro" foi retirado de MANGIA *et al* (2021). Nesse caso, a concentração do SDS puro foi mantida em 5%.

Ao analisar as curvas obtidas utilizando 1 %m/m de surfactante, é notável o atraso da cinética de conversão de monômero em relação ao padrão de SDS puro. Enquanto a reação padrão (SDS puro) converteu quase completamente o monômero em menos de 10 minutos, a conversão total em polímero só aconteceu por volta de 60 minutos para os ensaios conduzidos com surfactantes não iônicos. Entretanto, é importante ressaltar que não foi observada inibição da polimerização já que ao final das duas horas de reação foi obtida conversão de 100%. A inserção de apenas 10 %m/m de SDS na condição HLB14 provocou impactos na cinética. Em 30 minutos, foram convertidos quase 60% do MMA contra menos de 40% para a condição HLB14, conduzida sem SDS. Este é um importante resultado, pois indica que a presença de pequena quantidade de surfactante iônico pode impactar positivamente a reação de polimerização conduzida com surfactantes aniônicos.

O mesmo comportamento também foi observado para as reações com 3 %m/m de surfactantes. As conversões variaram de forma significativamente mais lentas nas reações conduzidas com surfactantes não iônicos do que nas reações conduzidas com SDS puro. A inserção de SDS na condição HLB8 acelerou a velocidade de aumento da conversão, chegando a quase 100% em 30 minutos. Apesar de utilizar o mesmo percentual mássico de SDS do ensaio anterior (10 %m/m), a quantidade de SDS inserida foi maior: 0,08 g de SDS foram usados para o ensaio de 3 %m/m, enquanto 0,03 g de SDS foram usados no ensaio anterior (conforme explicitado pela Tabela 3.1). Isto confirma a tendência de que o SDS acelera a conversão de monômero de maneira proporcional à massa usada.

Para 5 %m/m, a cinética de conversão dos surfactantes não iônicos aparentou ser mais rápida, quando comparada aos casos anteriores. Isso pode estar relacionado com a melhor estabilidade do sistema quando os surfactantes estão presentes em maior quantidade. Para o caso de adição de SDS, confirmou-se a tendência anterior. Na realidade, em menos de 30 minutos a totalidade de MMA já tinha sido convertida. Isso é importante porque foram usados apenas 0,13 g de SDS, ao contrário dos 0,8 g usados na reação conduzida com SDS puro, mostrando de forma original que é possível reduzir significativamente o uso de surfactantes iônicos para obtenção de conversões semelhantes.

A polimerização em miniemulsão é regida principalmente pelo mecanismo de nucleação de gotas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; HECHT *et al.*, 2013). Por isso, a velocidade de polimerização é dependente do tamanho de gota: quanto menor a gota, mais rápida é a variação da conversão do monômero. Na verdade, os surfactantes não iônicos podem estabilizar gotas com tamanhos mais elevados e mais dispersos do que os surfactantes iônicos (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; LANDFESTER *et al.*, 1999a). Isso está associado ao fato que a estabilização estérica precisa formar uma densa monocamada de moléculas adsorvidas para ser eficiente (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). Além disso, surfactantes iônicos são usualmente moléculas menores que se adsorvem mais rapidamente à interface, quando comparados aos surfactantes não iônicos (HECHT *et al.*, 2013). Assim, ao comparar com a estabilização por surfactantes iônicos, o uso de surfactantes não iônicos pode não ser tão eficiente em alguns casos, resultando em partículas maiores e conseqüentemente em velocidades de conversão de monômero mais lentas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

Para confirmar a hipótese de formação de gotas maiores, foi realizada a caracterização do látex produzido de acordo com o tamanho de partícula. Entretanto, notou-se que as amostras produzidas com 1 %m/m e 3 %m/m de surfactante apresentaram instabilidade após 24 horas da condução da reação. Foi observada ainda a formação de duas fases: látex estável (fase superior) e aglomerado polimérico rígido (fase inferior) (Figura 4.12). Apenas as formulações preparadas com SDS e com 5 %m/m se mantiveram estáveis após esse tempo. Este já é um indicativo importante a respeito da capacidade de estabilização de partículas utilizando TW80 e SP80 em concentrações reduzidas. Cabe ressaltar que as análises, cujos resultados estão dispostas na Figura 4.13 e na Tabela 4.2 foram efetuadas utilizando a fração dispersa (látex).

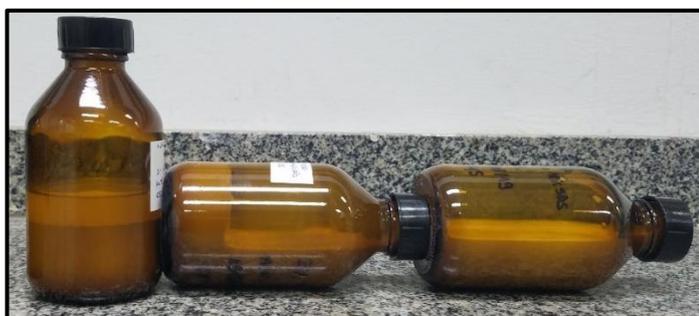


Figura 4.12. Registro fotográfico do látex polimérico obtido usando 3%*m/m* de surfactante. Notam-se duas fases imiscíveis, evidenciado pelo frasco do meio. A amostra à direita utilizou SDS em sua composição e destaca fase única.

Na Figura 4.13, pode-se observar a distribuição dos diâmetros das partículas sintetizadas em todas as condições testadas. As curvas exibiram comportamento monomodal e estreito em sua maioria, com deslocamento para tamanhos superiores quando usados os surfactantes não iônicos. Como esperado e descrito anteriormente, isto pode ser resultado do tipo de estabilização atuante no sistema. Surfactantes não iônicos precisam gerar uma cobertura densa, o que pode constituir conjunto de fenômenos lentos e complexos. Já para surfactantes iônicos, a repulsão eletrostática pode fornecer uma proteção melhor contra coalescência durante a reação de polimerização, sintetizando partículas menores. Apesar disso, a síntese de látexes monomodais foi possível em todos os casos, o que é vantajoso para o controle de qualidade de produto e confirma outros achados acerca do uso de surfactantes não iônicos para síntese de látexes poliméricos monodispersos (ALVES *et al.*, 2020; LANDFESTER *et al.*, 1999b).

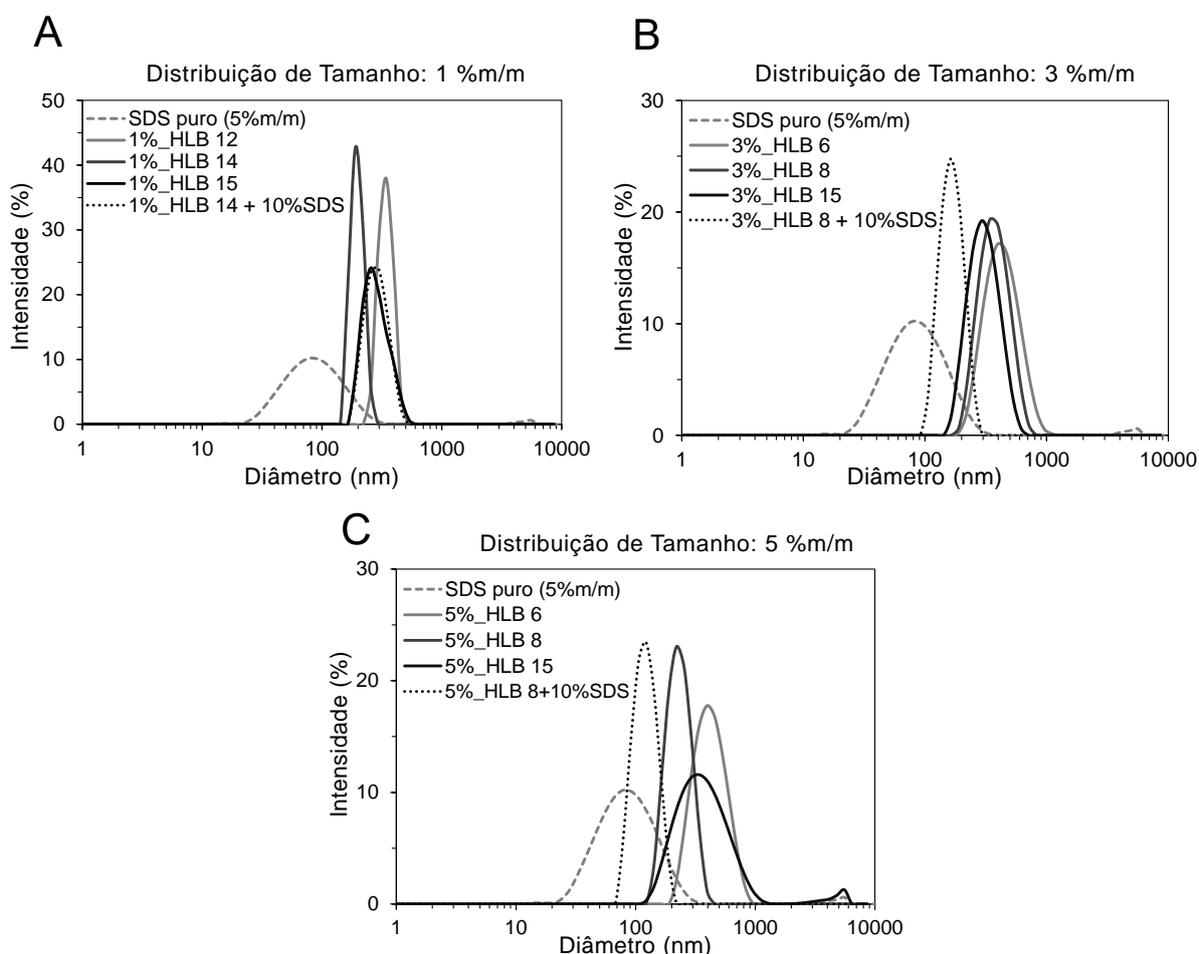


Figura 4.13. Distribuições de tamanho de partícula de látex de PMMA preparado com diferentes valores de HLB: A: 1 %m/m de surfactante; B: 3 %m/m de surfactante; C: 5 %m/m de surfactante. As linhas pontilhadas indicam a mistura de com SDS, adaptado de MANGIA *et al* (2022). As linhas tracejadas representam SDS puro, retirado de MANGIA *et al* (2021).

Os diâmetros de partícula obtidos confirmam as hipóteses levantadas durante a análise das trajetórias de conversão de monômero (Tabela 4.2). As reações conduzidas com os surfactantes não iônicos originaram partículas muito maiores do que as obtidas na reação padrão com SDS puro. Isso seria um indicativo que o tamanho de gota formado durante a condução da reação foi significativamente maior, originando nanopartículas sólidas maiores. Isso explicaria, portanto, a cinética de reação mais lenta.

Tabela 4.2. Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta do látex produzido em miniemulsão usando mistura de surfactantes não iônicos, adaptado de MANGIA *et al* (2022). O resultado comparativo "PMMA\_SDS puro" foi retirado de MANGIA *et al* (2021).

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro de Partícula (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
PMMA_SDS puro	76,6	0,23	-46,8
1%_HLB12	486,0	0,38	-52,0
1%_HLB14	454,2	0,55	-50,8
1%_HLB15	394,8	0,65	-49,3
1%_HLB14+10%SDS	277,6	0,01	-56,9
3%_HLB6	408,5	0,11	-52,4
3%_HLB8	354,4	0,08	-51,2
3%_HLB15	291,0	0,07	-55,8
3%HLB8+10%SDS	162,2	0,03	-49,8
5%_HLB6	396,0	0,10	-56,7
5%_HLB8	434,3	0,16	-62,0
5%_HLB15	352,1	0,24	-54,6
5%_HLB8+10%SDS	117,3	0,02	-50,3

Outro notável resultado é a redução significativa de diâmetro de partícula com a inserção de SDS no meio. Mesmo para as reações conduzidas com menores teores totais de surfactante, como no caso de 1 %m/m, a redução de tamanho de partícula foi expressiva. Para amostras preparadas com 5 %m/m, a diminuição chegou a valores próximos de 100 nm, o que é condizente com o objetivo perseguido no presente estudo, que visa ao desenvolvimento de aplicações biomédicas.

O índice de polidispersão (PDI) é também um importante parâmetro para caracterizar a uniformidade de distribuição de tamanho de partícula. Ele é calculado a partir da curva cumulativa de dados ( $PDI = \sigma^2 / \bar{x}^2$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão e  $\bar{x}$  é o tamanho médio) e valores de PDI abaixo de 0,04 caracterizam sistemas considerados altamente monodispersos (HACKLEY, 2015). Valores acima de 0,7 indicam que a distribuição é muito ampla e não indicada para análise em DLS (DANAIEI *et al.*, 2018). Assim, como os valores de PDI encontrados foram baixos, este seria outro indicativo da produção de látex monodisperso, característica também muito desejável para obtenção de látex homogêneo.

Outro ponto a considerar é a fração orgânica utilizada. Nos ensaios conduzidos com os surfactantes não iônicos, foi utilizada uma fração orgânica de 25%, enquanto na reação padrão de SDS puro este valor foi igual a 20%. A literatura reporta o conteúdo de sólidos como um importante fator que afeta a evolução da reação de polimerização e, conseqüentemente, o diâmetro de partícula (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). Entretanto, no caso analisado pode-se considerar que a troca do surfactante foi muito mais influente, já que o processo de estabilização de gotas foi completamente modificado com o uso de surfactantes de diferentes composições, de forma que a inserção de SDS possibilitou redução expressiva de tamanho das partículas de látex, indicando maior impacto do tipo de surfactante sobre o tamanho de partícula obtido. Esses resultados apresentam originalidade significativa e não foram ainda discutidos na literatura.

Ao analisar os resultados de potencial zeta, notou-se o elevado módulo, caracterizando um sistema com partículas eletricamente carregadas e com estabilidade controlada pela repulsão eletrostática. O valor negativo obtido mesmo para as formulações contendo apenas surfactantes não iônicos pode estar associado ao uso do iniciador aniônico (LANDFESTER *et al.*, 1999a). Adicionalmente, isto pode estar associado aos grupamentos oxigenados presentes nas estruturas químicas dos surfactantes TW80 e SP80. O SDS não exerceu influência significativa sobre esse parâmetro, mas há evidências que ele também poderia contribuir para aumento de módulo negativo quando em concentrações maiores (XIN *et al.*, 2013).

XIN *et al.* (2013) estudaram o efeito da combinação de surfactantes iônicos e não iônicos sobre a estabilidade de emulsões de óleo em água e concluíram que a estabilização por carga iônica tornou-se o mecanismo principal atuante no sistema (XIN *et al.*, 2013).

Esta conclusão também está de acordo com o que foi encontrado no presente estudo. Mesmo em pequenas concentrações, o SDS exerceu grande influência sobre a estabilização da emulsão, o que pode ser constatado pelo perfil mais rápido de conversão, pelo menor diâmetro de partícula obtido e pela observação visual da estabilidade de longo prazo. Esta última informação mostra a influência do SDS também na escala macroscópica, já que o látex ficou instável na ausência de SDS nas condições de 1 %m/m e 3 %m/m de surfactantes (Figura 4.12).

Do ponto de vista prático, os ensaios realizados permitem concluir que é possível reduzir a participação de surfactantes iônicos, considerados tóxicos, na síntese de nanopartículas de PMMA por polimerização em miniemulsão. Este fato é bastante valioso tendo em vista a aplicação biomédica desejada, que demanda o uso de solventes e componentes biocompatíveis, e a frequente documentação de processos de polimerização utilizando o surfactante aniônico como agente surfactante único no protocolo reacional.

## **Capítulo 5. Encapsulamento *in situ* de rivastigmina, síntese de nanopartículas de copolímeros funcionais e funcionalização de nanopartículas carreadoras de fármaco**

A seção anterior apresentou e discutiu os resultados obtidos acerca da produção de suspensões estáveis de nanopartículas do homopolímero PMMA (MANGIA *et al*, 2022). No presente capítulo, os conhecimentos adquiridos anteriormente são utilizados para investigar o encapsulamento *in situ* de rivastigmina e conduzir a copolimerização de MMA com comonômeros funcionais, com o objetivo de produzir nanopartículas de copolímeros carreadoras do fármaco.

### **5.1 Encapsulamento *in situ* de rivastigmina em PMMA**

Uma importante vantagem da técnica de polimerização em miniemulsão é a elevada flexibilidade para o encapsulamento de substâncias (sólidas ou líquidas, orgânicas ou inorgânicas, hidrofílicas ou hidrofóbicas) em partículas poliméricas (LANDFESTER, 2009). Neste contexto, o presente trabalho visou ao encapsulamento da formulação hidrofóbica do fármaco rivastigmina, a rivastigmina base livre (RBL).

Na literatura, o número de investigações de técnicas de encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas é escasso, sobretudo da formulação hidrofóbica. O uso da técnica de polimerização em miniemulsão direta possibilitou o uso de fase dispersante não tóxica, no caso a água, e a investigação do encapsulamento deste composto *in situ*. Ao permitir o encapsulamento durante o processo de produção da nanopartícula, pode-se também reduzir o número de estágios necessários para síntese de um nanocarreador de fármaco, tornando o processo mais atrativo do ponto de vista ambiental e comercial.

O valor do coeficiente de distribuição (D) da RBL é 4,27 a 37 °C e tampão fosfato pH 7 (EXELON, 2018), o que a caracteriza como uma molécula levemente hidrofóbica. Por se tratar de um líquido, o encapsulamento *in situ* pode ser facilmente implementado por meio da sua solubilização prévia na fase orgânica da miniemulsão.

Sabendo-se que diâmetros inferiores a 100 nm podem resultar em melhorias na biodistribuição das nanopartículas no corpo humano (ELSABAHY; WOOLEY, 2012), buscou-se estudar o encapsulamento de RBL em um protocolo de síntese cuja nanopartícula apresentasse esse diâmetro característico. Entretanto, a melhor composição experimental sugerida na Seção 4.3, a de 5%*m/m* HLB8 + 10%*SDS*, foi capaz de sintetizar partículas com tamanhos médios ligeiramente acima desse valor pretendido (117 nm de diâmetro). Levando-se em consideração que MANGIA *et al* (2021) obtiveram nanopartículas de PMMA de diâmetros inferiores a 80 nm (com e sem RBL) utilizando a mesma técnica de emulsificação por sonificador (MANGIA *et al.*, 2021) e que a Tabela 4.2 mostrou que a adição de SDS pode afetar significativamente esta característica, a homopolimerização de PMMA foi testada com 30 % de SDS. Após confirmação de redução de diâmetro de partícula, testou-se o encapsulamento de 1 %*m/m* de RBL. Entretanto, foi obtida uma eficiência de encapsulamento mediana de 55%, significativamente inferior aos 80% médios, obtidos por MANGIA *et al* (2021). Levando em consideração a notável distinção dos surfactantes usados, sugeriu-se que o TW80 possa ter influenciado o encapsulamento de RBL, motivando um ensaio de solubilidade, cuja integralidade está disposta no Apêndice 3. O ensaio concluiu que uma menor concentração de TW80 seria benéfica para o encapsulamento de RBL. Assim, a redução de TW80 (usando HLB6) e aumento mássico de SDS (para 30 %*m/m*) foram realizadas visando a aumentar a proporção de fármaco encapsulado.

A Figura 5.1 apresenta as trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações conduzidas com HLB variados e 30% de SDS. Ao compararmos as reações sem fármaco (PMMA\_HLB6 e PMMA\_HLB8), nota-se que não houve alteração significativa na conversão final por conta de mudança de proporção das concentrações de TW80 e SP80. Este fato já era esperado, já que as reações HLB6 e HLB8, conduzidas com 10 % de SDS e discutidas na seção anterior, também permitiram obter conversão completa (Figura 4.11).

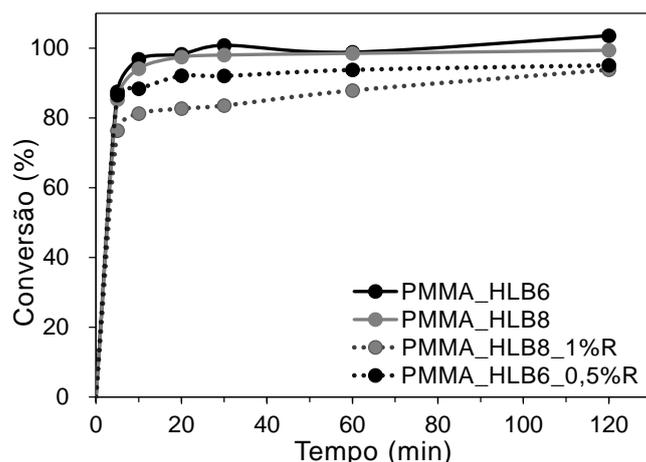


Figura 5.1. Trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações de encapsulamento *in situ* de RBL em PMMA com variados valores de HLB e 30% de SDS.

O aumento da concentração de SDS de 10% para 30%, contudo, acelerou a reação de polimerização: em 10 min já podia ser observada conversão completa de MMA, o que só foi obtido em 20 min para HLB8 + 10%SDS (Figura 4.11). Em relação à adição de RBL no meio, verificou-se uma pequena lentidão da cinética de polimerização; entretanto, tendo em vista a conversão superior a 90% ao final das 2h, pode-se dizer que o fármaco não causou inibição expressiva da reação de polimerização do monômero, o que pode ser considerado bastante positivo. Deve-se ressaltar que não é incomum observar fármacos ou ativos encapsulados que impactam consideravelmente a síntese e as propriedades de nanocarreadores poliméricos (OLIVEIRA *et al.*, 2011, 2012b, a). Então o fato de a RBL permitir conversão completa é extremamente propício e desejável para a síntese dos nanocarreadores poliméricos.

A Figura 5.2 ilustra a evolução do diâmetro médio de partículas durante as reações de polimerização contendo 30% de SDS, na ausência e presença do fármaco. As reações conduzidas na ausência do fármaco (Figura 5.2 - A e B) resultaram em distribuições de tamanhos de partícula monomodais e estreitas, caracterizando um látex polimérico monodisperso. A adição de RBL, nas duas concentrações testadas, não impactou esta característica do látex: a suspensão obtida também apresentou distribuição de tamanho monomodal e estreita. Outro ponto relevante foi a manutenção do tamanho ao longo do curso da polimerização. Esse comportamento, confirmado pela sobreposição das curvas, atendeu ao princípio básico esperado da polimerização em miniemulsão, em que cada gota da miniemulsão pode ser tratada como um nanorreator na síntese de uma partícula,

sem alteração expressiva de tamanho (LANDFESTER, 2001; LANDFESTER *et al.*, 1999a). Dessa forma, confirmou-se que a adição de fármaco ou modificação de proporção de SP80 e TW80 não impactaram a obtenção de um látex nanométrico monomodal.

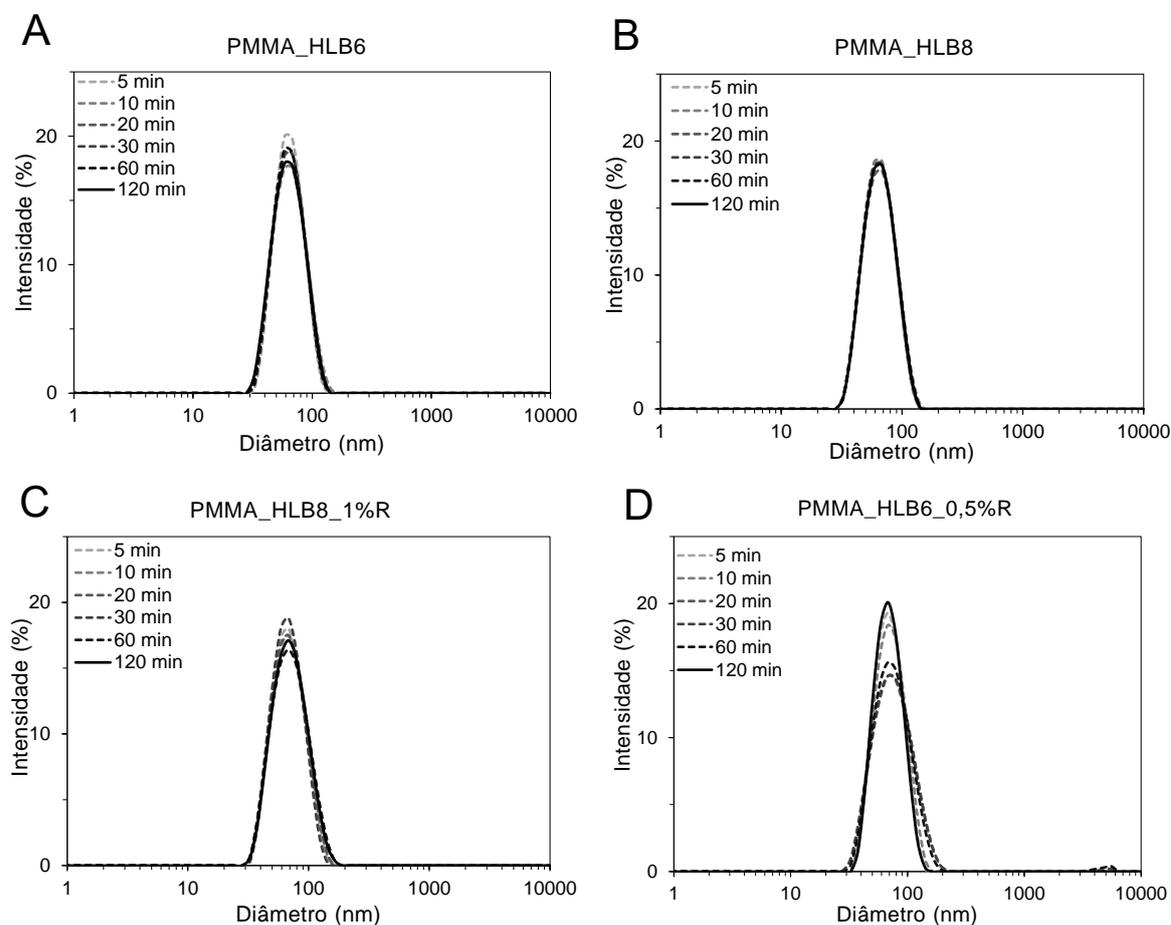


Figura 5.2. Distribuição de tamanhos de partícula ao longo das 2 horas de polimerização em miniemulsão de MMA com e sem encapsulamento *in situ* de RBL com HLB variados e 30% de SDS. A- branco PMMA usando HLB 6 e 30% de SDS, B – branco PMMA usando HLB 8 e 30% de SDS, C- encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL usando HLB 6 e 30 % de SDS e D – encapsulamento *in situ* de 1% de RBL usando HLB 8 e 30% de SDS.

A Tabela 5.1 exibe algumas propriedades físico-químicas dos látexes sintetizados na ausência e presença da RBL. Os diâmetros médios de partícula obtidos confirmam as tendências sugeridas no gráfico de distribuição de tamanhos. As reações conduzidas na ausência e na presença de RBL pouco variaram o diâmetro médio (variação de menos de 10%) e apresentaram baixo PDI (<0,7), o que é consistente com uma distribuição homogênea de tamanhos (DANAIEI *et al.*, 2018).

Tabela 5.1. Tamanhos médios, PDIs, potenciais zeta e eficiências de encapsulamento para os látexes produzidos nas reações de homopolimerização de MMA com encapsulamento *in situ* de RBL.

Amostra	Diâmetro de Partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulamento(%)
PMMA_HLB6	61,4	0,07	-45,5	
PMMA_HLB8	62,2	0,07	-39,0	
PMMA_HLB6_0,5%R	66,1	0,06	-48,9	89,4
PMMA_HLB8_1%R	66,1	0,09	-41,1	55,3

Em relação ao potencial zeta, notou-se a repetição dos valores negativos condizentes com o uso do iniciador KPS e dos surfactantes (o aniônico SDS e do não iônico TW80 com elementos oxigenados). Comparando-se com os valores obtidos na ausência de SDS (Tabela 4.2), observou-se que os valores apresentaram módulos inferiores, contrariando o que era inicialmente esperado. Uma possível explicação pode estar relacionada ao número de partículas, já que os diâmetros reduzidos (61 nm contra 396 nm) indicam o maior número de partículas. A distribuição dos surfactantes em mais partículas e mais área interfacial reduz a concentração superficial do emulsificante e reduz o valor do potencial zeta. A influência do surfactante também foi notável na eficiência de encapsulamento.

Foi também confirmado que o surfactante TW80 modifica a solubilidade da RBL em água (Apêndice 3), o que pode afetar a eficiência de encapsulamento. De fato, o uso de surfactantes pode constituir uma estratégia para aumentar a solubilidade de dispersões e fármacos pouco solúveis em água (CHAUDHARI; DUGAR, 2017; PARK; CHOI, 2006). Por isso, presume-se que a redução da concentração de TW80 pode aumentar a partição do fármaco na fase orgânica e aumentar a eficiência do encapsulamento. De fato, essa hipótese foi confirmada, pois a eficiência de encapsulamento aumentou significativamente de 55% para 89% com a redução do surfactante TW80 (Tabela 5.1), elevando o potencial deste sistema como um nanocarreador deste fármaco.

A superioridade da nanoformulação sintetizada aqui pode ser facilmente comprovada quando se comparam os dados obtidos com os dados disponíveis na literatura acerca do encapsulamento de RBL. MOHAMADPOUR *et al* (2020) obtiveram apenas 40% de eficiência de encapsulamento utilizando o método de nanoprecipitação

(MOHAMADPOUR *et al.*, 2020). Já CRAPARO *et al* (2008) e HEMMATI *et al* (2016) testaram a adsorção física como metodologia para associar a base polimérica e o fármaco, conseguindo eficiências de 12 %m/m e 68,74 mg/g respectivamente (CRAPARO *et al.*, 2008; HEMMATI *et al.*, 2016). Além dos valores serem inferiores aos 35,6 %m/m (=  $0,8942 \times 0,1$  g RBL) encontrados no presente trabalho, a fixação por adsorção pode ser fraca e instável. Isso foi efetivamente comprovado em um ensaio de liberação comparativo, que mostrou que partículas preparadas com auxílio do método de adsorção apresentaram cinética mais rápida em relação a outro método de encapsulamento (CRAPARO *et al.*, 2008). Dessa forma, o encapsulamento *in situ* conduzido aqui com 5 %m/m HLB6 + 30%SDS pode apresentar elevada capacidade de encapsulamento com maior durabilidade, o que seria extremamente conveniente do ponto de vista de qualidade de produto e aumento de tempo de prateleira. Além disso, a redução de diâmetro de partícula e maior eficiência de encapsulamento justificam a escolha deste protocolo (HLB6 + 30% m/m de SDS) em futuros ensaios experimentais desta tese.

O formato, a agregação e a distribuição de tamanho de nanopartículas foram também avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (CRUCHO; BARROS, 2017). A Figura 5.3 apresenta as micrografias obtidas para amostras obtidas nos ensaios PMMA\_HLB6 e PMMA\_HLB6\_0,5%R, que foram usadas para avaliar a influência do encapsulamento de RBL nas propriedades estruturais das nanopartículas.

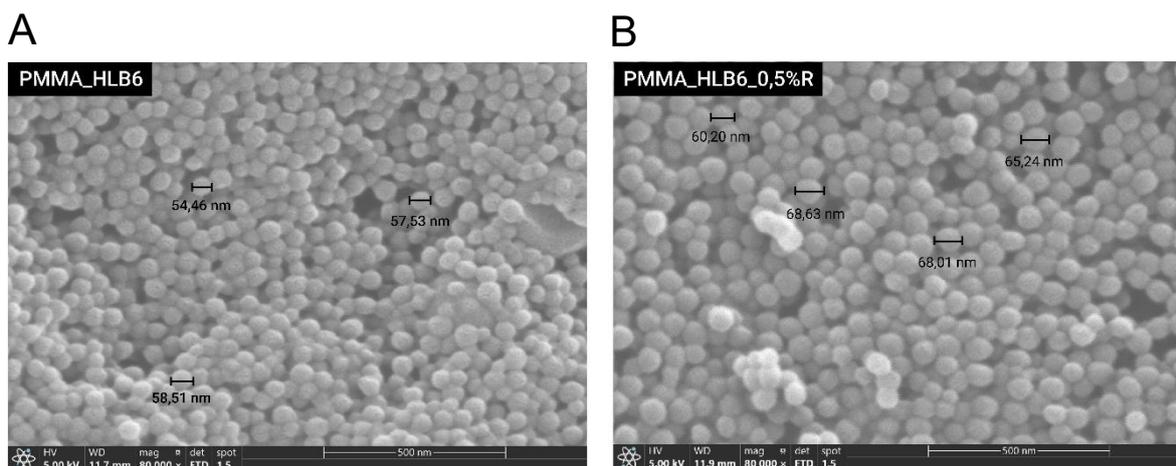


Figura 5.3. Micrografias eletrônicas de varredura do homopolímero PMMA produzido por miniemulsão conduzida com HLB6 e 30% de SDS: A- material branco (sem fármaco) e B- material sintetizado com encapsulamento *in situ* de 0,5% de fármaco.

As micrografias mostraram que as amostras PMMA\_HLB6 e PMMA\_HLB6\_0,5%R apresentaram nanopartículas de formato esférico e com diâmetros significativamente inferiores à escala utilizada de 500 nm. Dessa forma, confirma-se o êxito da metodologia de polimerização em miniemulsão na síntese de partículas na escala nanométrica e de forma homogênea. Outro ponto importante é a elevada correspondência observada entre os valores de diâmetro médio obtidos a partir da técnica microscópica e da técnica de espalhamento de luz: 56,83 nm contra 61,36 nm para PMMA\_HLB6, e 65,62 nm contra 66,10 nm para PMMA\_HLB6\_0,5%R, respectivamente. Isto não só confirma os valores obtidos pela última técnica, como reforça a grande confiabilidade dos resultados obtidos.

A modificação da matriz polimérica a partir da introdução de RBL no meio foi verificada por RMN, TGA e DSC. A técnica de RMN permitiu avaliar se houve alteração química no material polimérico provocada pela RBL. A Figura 5.4 apresenta os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN obtidos para as amostras PMMA\_HLB6 e PMMA\_HLB6\_0,5%R. É notável a grande semelhança entre os dois espectros, sugerindo elevada equivalência química entre as composições dos materiais.

O polímero PMMA apresenta quatro sinais característicos nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, dos quais três estão presentes em ambos os espectros e assinalados na Figura 5.4: o pico em 3,5 ppm (A), que se refere ao grupo metila ligado ao éster na cadeia lateral do PMMA; o pico em 1,7 ppm (B), que é relacionado aos grupos metilenos da cadeia

principal; e os sinais entre 0,7 e 1 ppm (C), associados aos prótons do grupo metila ligado à cadeia principal (KOSTRZEWSKA *et al.*, 2015). O 4º e último sinal são referentes aos picos posicionados entre 5,5 e 6,0 ppm, associados à ligação dupla do monômero MMA (KOSTRZEWSKA *et al.*, 2015), que neste caso estão ausentes, indicando polimerização completa. Em 7,2 ppm observa-se o sinal relativo ao solvente clorofórmio utilizado, mas o duplete de grupo aromático entre 7,0 e 7,3 ppm, que poderia ser usado para identificar o fármaco RBL, está ausente mesmo na amostra PMMA\_HLB6\_0,5%R. O mesmo foi observado por MANGIA *et al* (2021) e foi associado à baixa massa de fármaco (MANGIA *et al.*, 2021). Dessa forma, podemos concluir que a análise  $^1\text{H}$ -RMN indicou que o fármaco não alterou a composição química do polímero PMMA e não copolimerizou, sendo este um fato bastante favorável para previsibilidade de propriedades dos nanocarreadores.

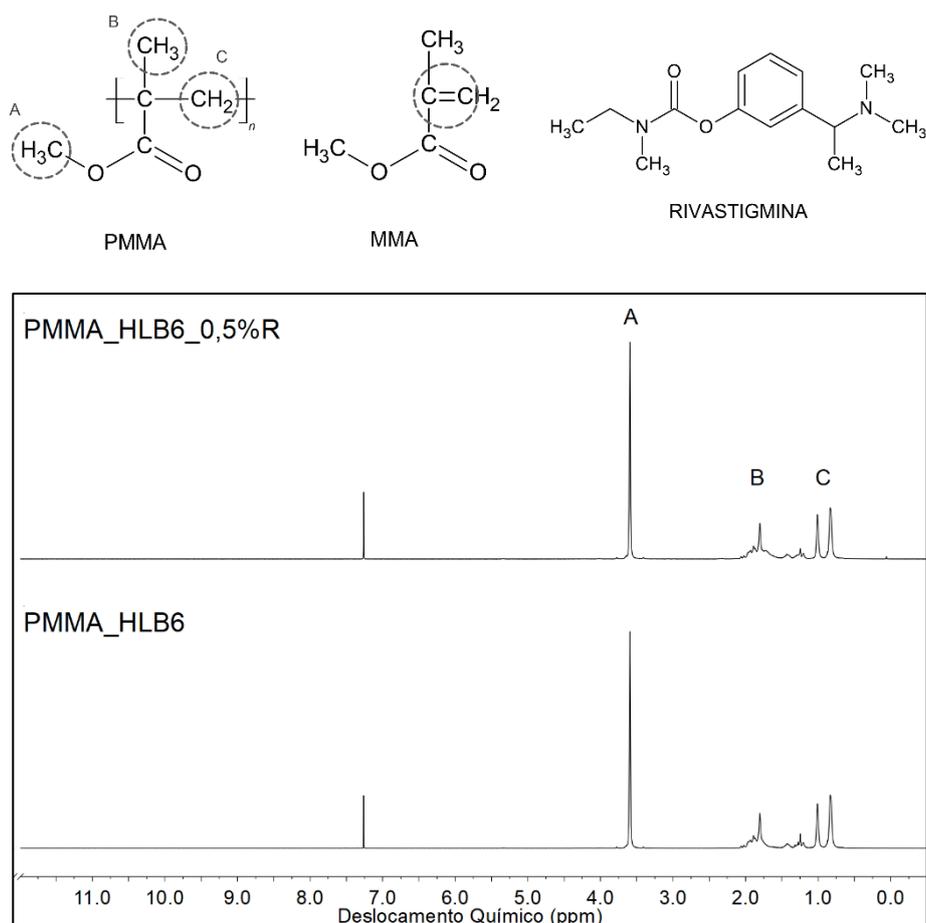


Figura 5.4. Espectros de RMN- $^1\text{H}$  para PMMA branco e para PMMA com encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL, ambos produzidos em miniemulsão com HLB6 e 30% de SDS.

Adicionalmente, as análises de TGA e DSC foram realizadas para investigação de mudanças de propriedades térmicas acarretadas pela inserção de RBL no meio. A técnica de TGA permite analisar a faixa de degradação dos polímeros (CANEVAROLO JR., 2006). A Figura 5.5 apresenta os termogramas de TGA e DSC obtidos para as amostras PMMA\_HLB6 e PMMA\_HLB6\_0,5%R.

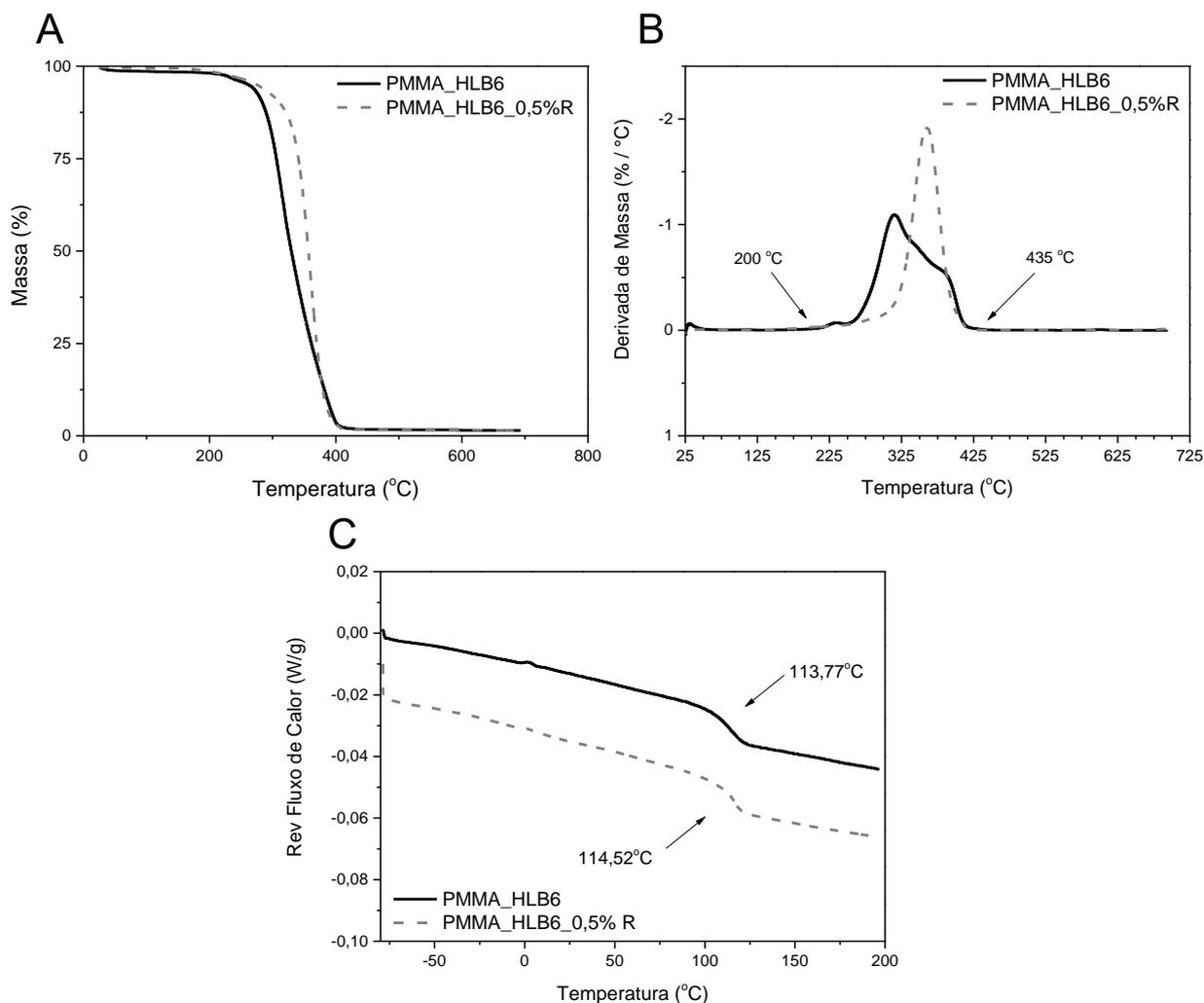


Figura 5.5. Análises térmicas realizadas para PMMA branco e para PMMA com encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL, ambos produzidos em miniemulsão com HLB6 e 30% de SDS. A - Termograma de TGA de perda de massa, B- Derivada de perda de massa de TGA, e C- curvas de DSC com os valores de Tg calculados.

Ambas as amostras apresentaram curvas de decomposição semelhantes com início de perda de massa próximo a 200 °C (Figura 5.5 -A). A sobreposição do início e término das curvas de derivada (Figura 5.5 - B) também indicou uma similaridade de composição entre as amostras, ficando mais explícito o início de perda de massa em 200 °C. O PMMA

pode apresentar perfil de decomposição em duas etapas (180-350 °C e 350-400°C) quando submetido a taxas de aquecimento superiores a 3,7 °C/min e a atmosfera de N<sub>2</sub> (PETERSON; VYAZOVKIN; WIGHT, 1999), exatamente o que foi encontrado para a amostra PMMA\_HL6 (Figura 5.5 - B). A amostra contendo o fármaco reduziu o primeiro pico de aquecimento, geralmente associado às ligações mais fracas, como grupos terminais, grupos vinila e fragmento de iniciadores (NIKOLAIDIS; ACHILIAS, 2018; PETERSON *et al.*, 1999). Essa mudança pode indicar modificação das massas molares por conta da presença do fármaco e a ocorrência de reações de transferência de cadeia, já observada em outros sistemas de encapsulação *in situ* (ALVES *et al.*, 2021). Entretanto, devido às similaridades existentes entre as curvas de perda de massa, as temperaturas também similares de início e término de degradação e ausência de *plateau* na curva de perda de massa, considerou-se que não houve modificação química significativa com a adição de RBL no meio, de acordo com as análises de TGA.

Os espectros de DSC (Figura 5.5 - C) também confirmaram a similaridade química entre o homopolímero puro e com o fármaco. O PMMA\_HLB6 apresentou perfil único de inflexão, indicando Tg única do material em 113,77 °C. O valor de Tg é próximo ao da literatura de Tg, igual a 125 °C (HUGHES; BROWN, 1961), sugerindo boa correspondência com o valor experimental obtido. O perfil do PMMA\_HLB6\_0,5%R foi muito semelhante ao do placebo, com Tg única posicionada em 114,52 °C. Este é um resultado muito positivo, pois indica que o fármaco não apresenta comportamento plastificante, efeito encontrado por outros fármacos na literatura (ALVES *et al.*, 2021). Dessa forma, concluiu-se que o fármaco preservou a estrutura e o comportamento térmico do polímero, e não alterou sua termodegradabilidade. Dessa forma, à temperatura ambiente, a integridade da partícula seria mantida.

Com os ensaios de encapsulamento *in situ*, mostrou-se que a concentração do surfactante TW80 afetou a eficiência de encapsulamento do fármaco. A introdução de RBL no meio não influenciou a condução da reação e não alterou propriedades estruturais e térmicas das nanopartículas do homopolímero, permitindo previsibilidade de comportamento do material.

## 5.2 Copolimerização de MMA com AA, BA e HEMA

A copolimerização com AA, BA e HEMA (Figura 5.6) foi a estratégia adotada para adicionar funcionalidades específicas nas partículas de PMMA sintetizadas. A introdução de AA e HEMA permitem adicionar grupos funcionais COOH e OH, respectivamente, na superfície das partículas, possibilitando o uso de metodologias de adsorção química de biomoléculas (HERMANSON, 2008). Além disso, melhorias na capacidade de liberação de fármaco encapsulado foram investigadas a partir da copolimerização com BA e HEMA, para mudar as propriedades térmicas e cristalinas do material obtido. Ambos os comonômeros permitem modificar a mobilidade das cadeias por conta da baixa Tg induzida pela presença do BA (-54 °C) (HUGHES; BROWN, 1961) e comportamento de hidrogel induzido pela adição do HEMA (VARGÜN *et al.*, 2010), respectivamente.

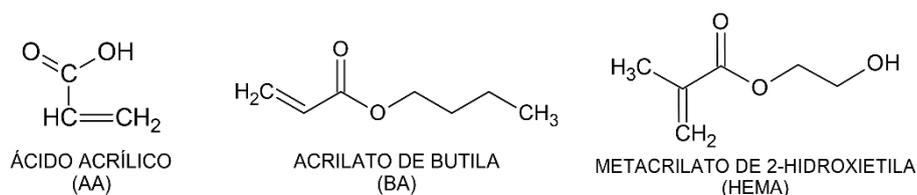


Figura 5.6. Fórmula estrutural dos comonômeros utilizados para adicionar novas funcionalidades ao polímero base PMMA.

Primeiramente, foi necessário estudar a influência da introdução destes comonômeros na cinética de polimerização e nas propriedades das partículas obtidas. Como a copolimerização de P(MMA-AA) já se mostrou capaz de produzir nanopartículas com elevada conversão e potencial de funcionalização (CAMPOS *et al.*, 2016; MANGIA *et al.*, 2021), optou-se por estudar especificamente a copolimerização de MMA com HEMA e com BA, e os terpolímeros formados entre os 3 monômeros (PMMA-BA-AA e PMMA-BA-HEMA).

A Figura 5.7 expõe as trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações de copolimerização estudadas. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS; por isso, essa informação foi removida das legendas de figuras para facilitar a compreensão. A exceção diz respeito à reação de copolimerização entre P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS; entretanto, devido à

elevada similaridade entre PMMA\_HLB6 e PMMA\_HLB8, admitiu-se que P(MMA-HEMA)10%\_HLB8 seria conduzida de forma semelhante à da reação conduzida com HLB6.

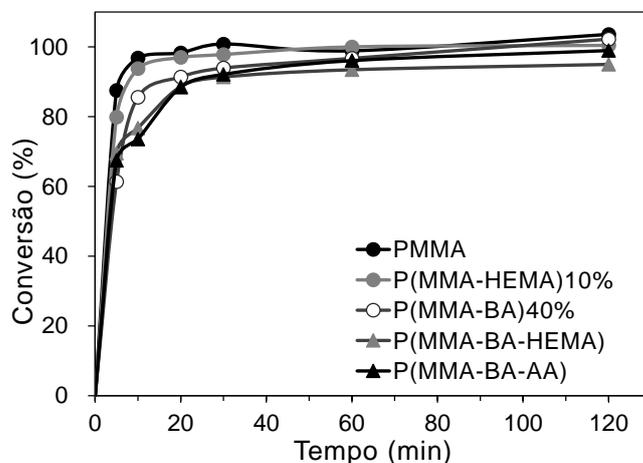


Figura 5.7. Trajetórias de conversão de monômero obtidas para os ensaios de copolimerização em miniemulsão. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação de copolimerização P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

De acordo com a Figura 5.7, confirmou-se que a introdução dos monômeros não alterou a conversão final do polímero. Na verdade, após 30 minutos foi possível observar conversões quase completas para todos os casos estudados. Esta é uma valiosa vantagem do processo proposto, pois não houve atraso ou inibição significativa da polimerização por quaisquer dos componentes. Adicionalmente, a reação de polimerização também foi avaliada a partir do acompanhamento das distribuições dos tamanhos de partícula, como apresentado na Figura 5.8.

Analogamente ao caso controle PMMA\_HLB6 (Figura 5.2), foram obtidos perfis monodispersos e nenhum dos copolímeros estudados provocou deslocamento significativo de tamanhos de partícula ao longo da reação. Isso indica que o mecanismo de polimerização mais atuante também foi o de nucleação homogênea, o que reforça a propriedade da metodologia de polimerização em miniemulsão utilizada.

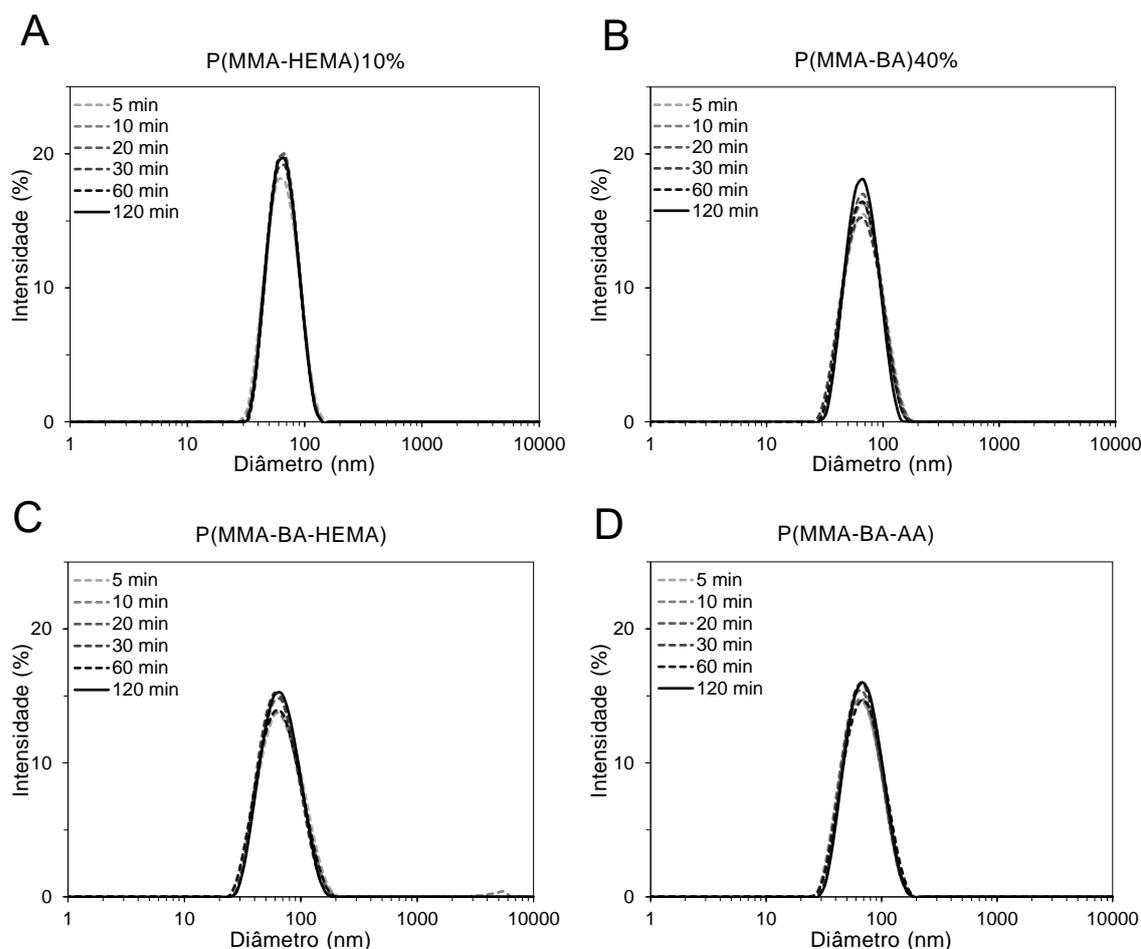


Figura 5.8. Distribuições de tamanhos de partícula ao longo das 2 horas de reação para os ensaios de copolimerização em miniemulsão. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS com exceção da reação de copolimerização P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

A síntese de nanopartículas poliméricas foi bem sucedida para todas as combinações testadas, como mostram os valores dos diâmetros médios da Tabela 5.2. As dimensões nanométricas das partículas obtidas foram similares às do polímero controle (PMMA\_HLB6), indicando que os comonômeros não afetaram esta propriedade. Adicionalmente à distribuição estreita, já representada na Figura 5.8, o PDI confirmou a monodispersão dos látexes obtidos. A única propriedade com pequena modificação foi o potencial zeta. Entretanto, considerando os valores de potencial zeta obtidos na Seção 4.2 (Tabela 4.2), foram obtidos valores similares (5% PMMA\_HLB8 com -62,00 mV e P(MMA-BA)40% com -66,00mV), o que permitiu isentar a influência do comonômero nesta propriedade, reforçando a importância dos surfactantes e do iniciador para a definição do potencial zeta.

Tabela 5.2. Tamanhos médios, PDIs e potenciais zeta dos látexes produzidos nas reações de copolimerização com MMA.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro de Partícula (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
PMMA_HLB6	61,4	0,07	-45,5
P(MMA-HEMA)10%	62,7	0,05	-42,5
P(MMA-BA)40%	63,1	0,07	-66,0
P(MMA-BA-HEMA)	61,9	0,11	-55,2
P(MMA-BA-AA)	66,0	0,11	-64,8

Apesar dos comportamentos similares dos copolímeros em relação à conversão de monômero, ao diâmetro médio de partícula e ao potencial zeta, a composição dos polímeros afetou a distribuição de massas molares do produto, conforme indicado na Figura 5.9. A copolimerização com o BA estreitou a curva de distribuição e a deslocou levemente para massas molares superiores. Isso pode ter relação com o mecanismo de terminação de cadeia do BA, que é diferente do MMA. Enquanto o MMA termina principalmente por desproporcionamento, o BA tende a terminar principalmente por combinação, aumentando a possibilidade de formação de cadeias com maiores massas molares (BARTH *et al.*, 2010; EROLA *et al.*, 2015). BARTH *et al.* (2010) mostraram também que o BA é capaz de apresentar um mecanismo de transferência de cadeia intramolecular, chamado *backbiting*, especialmente atuante em temperaturas altas, que também pode controlar a taxa de terminação de radicais (BARTH *et al.*, 2010) e, portanto, impactar a formação e tamanho de cadeias.

A introdução de HEMA também provocou um comportamento diferenciado para a distribuição de massas molares, com uma segunda moda em massas molares maiores. Isto indicaria a existência de populações de cadeias com comprimentos diferenciados. De acordo com PEIXOTO *et al.* (2013), HEMA seria capaz de realizar reações de transferência de cadeia e reticulação por meio dos grupos funcionais OH, produzindo polímeros com massas molares maiores (PEIXOTO, 2013). Dessa forma, as curvas bimodais sugerem a existência de cadeias reticuladas e não reticuladas, mostrando uma heterogeneidade do produto polimérico.

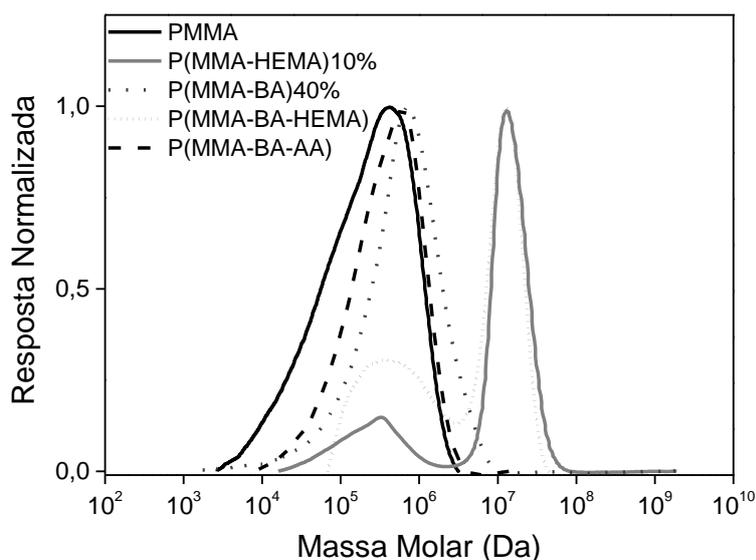


Figura 5.9. Distribuições de massas molares obtidas para os polímeros finais dos ensaios de copolimerização em miniemulsão. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS com exceção da reação de copolimerização P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

A fim de complementar a discussão acerca das massas molares, a Tabela 5.3 apresenta os valores de massa molar numérica ( $M_n$ ) e ponderal ( $M_w$ ) médias, e a polidispersão ( $M_w/M_n$ ) obtidos. Todos os materiais sintetizados foram considerados polímeros (massa molar média acima de 10 kDa, (CANEVAROLO JR., 2006)), indicando que todas as reações poliméricas foram bem sucedidas. Em especial, notou-se que o PMMA apresentou alta dispersão, dada pelo elevado valor de  $M_w/M_n$ , o que também foi sugerido na Figura 5.9 pela larga distribuição de massas molares. O deslocamento para massas molares maiores fica evidente ao compararmos a  $M_n$  do PMMA e dos polímeros contendo BA. Já para as amostras contendo HEMA, foram obtidos polímeros com altas massas molares (acima de 250 kDa (CANEVAROLO JR., 2006)), evidenciado por valores muitas vezes superiores àqueles obtidos para o PMMA e confirmando a possível ocorrência de reticulação. De forma geral, os copolímeros apresentaram bom controle de dispersão, com comportamento característico de polimerização por adição, por apresentarem  $M_w/M_n$  entre 2 e 5 (CANEVAROLO JR., 2006).

Tabela 5.3. Massas molares numéricas médias (Mn), massas molares ponderais médias (Mw) e polidispersões (Mw/Mn) dos polímeros finais dos ensaios de copolimerização em miniemulsão.

Amostra	Mn (kDa)	Mw(kDa)	Mw/Mn
PMMA_HLB6	47,76	329,16	6,89
P(MMA-HEMA)10%	1,26x10 <sup>4</sup>	1,57x10 <sup>4</sup>	1,25
P(MMA-BA)40%	78,75	206,20	2,62
P(MMA-BA-HEMA)	1,04x10 <sup>4</sup>	1,28x10 <sup>4</sup>	1,23
P(MMA-BA-AA)	139,27	486,48	3,49

A composição química dos copolímeros também foi investigada com auxílio dos espectros de FTIR e <sup>1</sup>H-RMN. A Figura 5.10 apresenta os espectros FTIR obtidos para os copolímeros após as reações de polimerização. Notou-se grande semelhança entre os espectros do polímero PMMA e os copolímeros (Figura 5.10-A). Esse fato se deve à elevada semelhança dos grupos funcionais presentes no homopolímero e nos copolímeros. A Figura 5.10-B permite uma análise mais detalhada dos sinais mais característicos. Em 2900 cm<sup>-1</sup>, 1720 cm<sup>-1</sup> e 1100 cm (1145 cm<sup>-1</sup> aqui) podem ser encontrados os sinais atribuídos às ligações O-H, C=O e C-O-C, respectivamente, de ácido carboxílico e éster, que podem ser encontradas no homopolímero, comonômeros e copolímeros (CAMPOS *et al.*, 2016; CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; RIBEIRO; SOUZA, 2007).

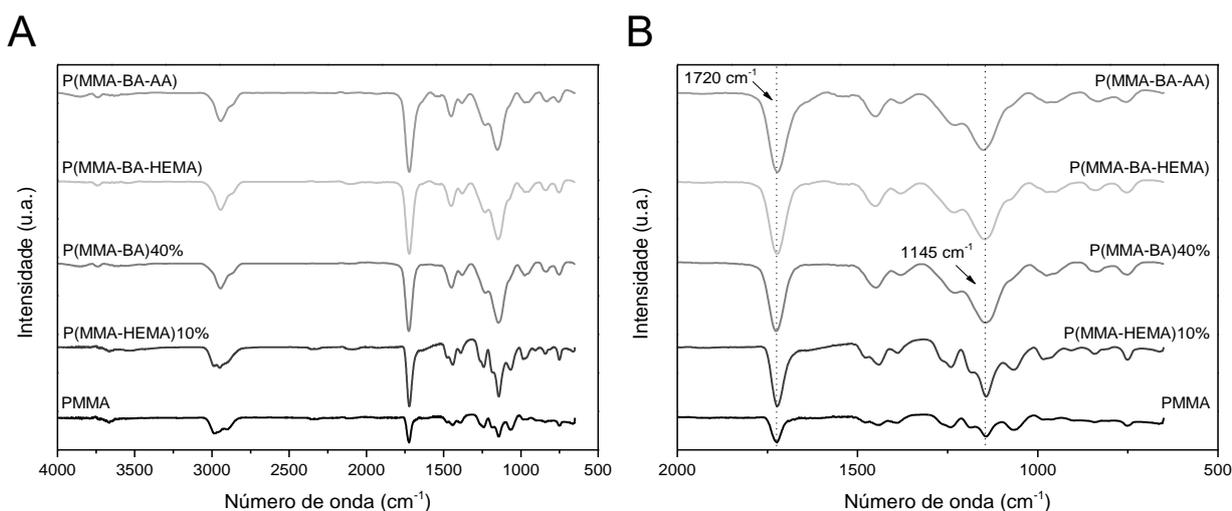


Figura 5.10. Espectros de FTIR obtidos para os materiais obtidos nos ensaios de copolimerização em miniemulsão. A- Espectro de FTIR completo. B- Zoom na região *fingerprint* entre 2000 cm<sup>-1</sup> e 650 cm<sup>-1</sup>. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

Devido à grande similaridade estrutural dos copolímeros e homopolímero, os espectros de FTIR não foram conclusivos para a confirmação da copolimerização. Por isso, os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foram usados para identificar os grupos funcionais e avaliar o sucesso da copolimerização. A Figura 5.11 apresenta os resultados de  $^1\text{H}$ -RMN obtidos para os copolímeros.

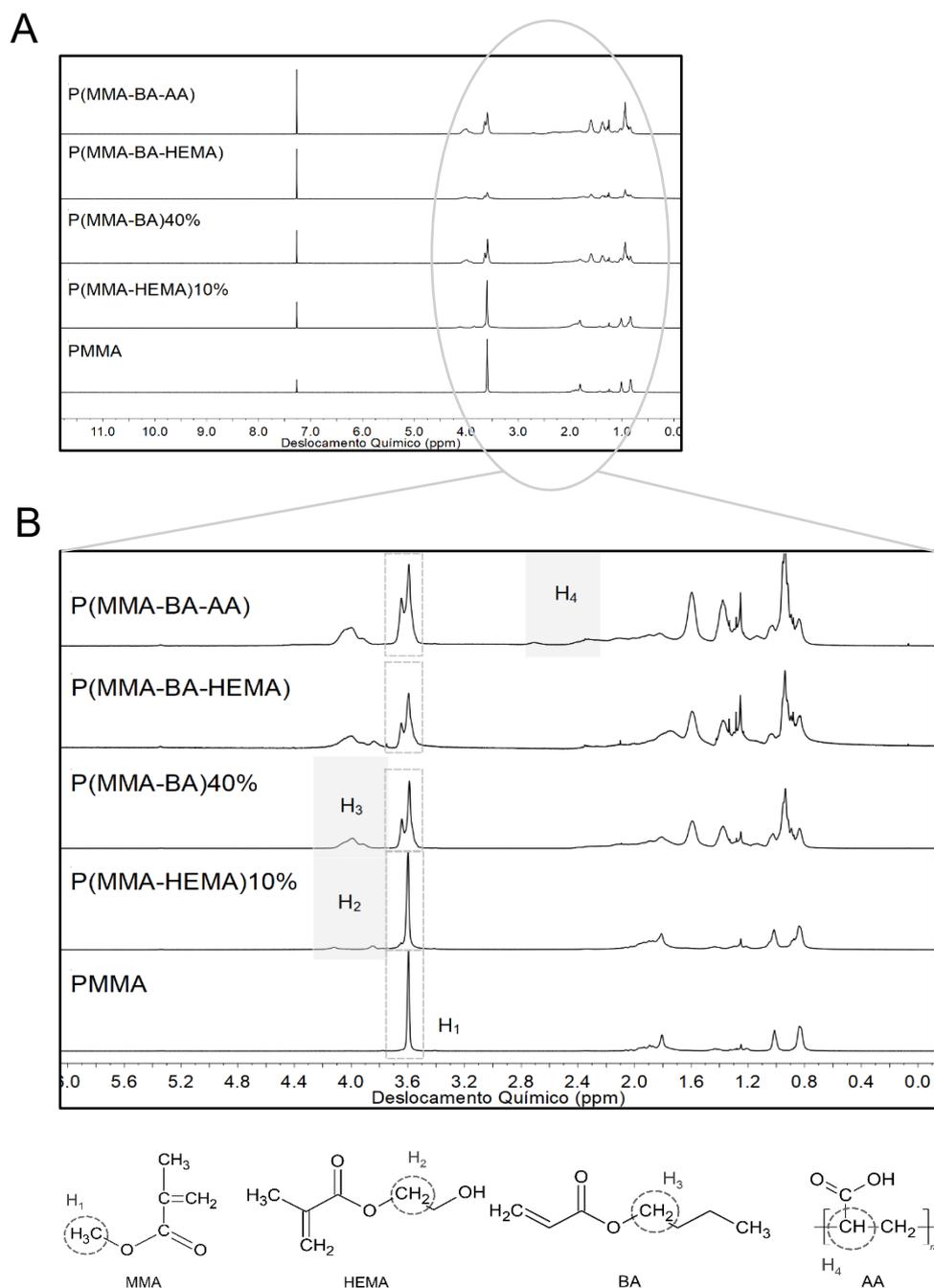


Figura 5.11. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN obtidos para os copolímeros. A- Espectro completo. B- Zoom na região de análise de copolimerização. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

A Figura 5.11-A identificou os picos associados ao solvente deuterado em  $\delta=7,2$  ppm e mostrou ausência do duplete em  $\delta=5,2-5,7$  ppm associado à ligação dupla  $\text{CH}_2$  de monômeros. Assim, foram confirmados os elevados resultados de conversão obtidos utilizando a técnica de gravimetria e já apresentados anteriormente. Já análise da Figura 5.11-B permitiu identificar com mais clareza os sinais associados às estruturas específicas presentes em cada material, conforme indicado nas fórmulas estruturais na parte inferior da figura.

Os sinais característicos do PMMA ( $\delta=3,6$  ppm do éster  $\text{O-CH}_3$ ;  $\delta=1,6-2,0$  ppm do grupo metileno e  $\delta=0,8-1,0$  ppm do grupo metila) estão presentes em todos os espectros analisados, confirmando a estrutura polimérica do PMMA. Em especial, o pico  $\delta=3,6$  ppm do éster  $\text{O-CH}_3$ , sinalizado como  $\text{H}_1$  por uma região pontilhada na figura, foi utilizado para identificação e quantificação de PMMA na estrutura final dos copolímeros, corroborando a característica reportada na literatura (CAMPOS *et al.*, 2016; EROLA *et al.*, 2015; VARGÜN *et al.*, 2010). Para a identificação dos outros materiais, foi necessário utilizar outras regiões de análise.

Para o HEMA, foi usado o sinal  $\delta=4,2$  ppm relativo à ligação  $\text{O-CH}_2$  presente na estrutura química e assinalado na figura como  $\text{H}_2$  (VARGÜN *et al.*, 2010). Adicionalmente, também é notável o sinal  $\delta=3,9$  ppm relativo a  $\text{CH}_2\text{-OH}$  (VARGÜN *et al.*, 2010), confirmando a presença deste material no comonômero P(MMA-HEMA)10%. De forma análoga, o BA também possui uma ligação  $\text{O-CH}_2$  com sinal característico em  $\delta=3,8$  a  $4,10$  ppm (EROLA *et al.*, 2015), sendo portanto o sinal identificado como  $\text{H}_3$  e usado para identificação e quantificação da presença de BA nos copolímeros de P(MMA-BA)40% e P(MMA-BA-AA). Devido à grande similaridade estrutural do HEMA e do BA, não foi possível separar as contribuições específicas no terpolímero P(MMA-BA-HEMA). O Apêndice 4 mostra um estudo comparativo entre os espectros preditos de cada material e o espectro do material P(MMA-BA-HEMA), identificando a proximidade dos sinais, o que dificulta no reconhecimento da contribuição individual de cada comonômero no terpolímero. Assim, para os cálculos de copolimerização, especificamente para P(MMA-BA-HEMA), foi considerada uma contribuição conjunta HEMA-BA no copolímero.

Por fim, para a análise da incorporação de AA foi usado o sinal característico em  $\delta=2,3-2,6$  ppm ( $\text{H}_4$ ) presente somente no copolímero (CAMPOS *et al.*, 2016). Dessa forma, ao realizar as integrais referentes a cada estrutura ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ) e usar como

referência o sinal H<sub>1</sub> (do grupo O-CH<sub>3</sub> do MMA), foi possível estimar o número de mols e, conseqüentemente, o conteúdo do MMA no polímero (CAMPOS *et al.*, 2016; EROLA *et al.*, 2015; VARGÜN *et al.*, 2010). As fórmulas para cálculo da composição média dos copolímeros estão dispostas no Apêndice 5 e os resultados estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Composições molares (F<sub>i</sub>) e mássicas (w<sub>i</sub>) dos copolímeros, de acordo com os cálculos realizados com base nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

<b>Amostra</b>	<b>MMA</b> δ = 3.3-3.75 ppm <sup>1</sup>	<b>HEMA</b> δ = 4.2 ppm <sup>3</sup>	<b>BA</b> δ = 3.8-4.10 ppm <sup>1</sup>	<b>AA</b> δ = 2.3-2.6 ppm <sup>2</sup>
P(MMA-HEMA)10%	F <sub>MMA</sub> = 0,89 w <sub>MMA</sub> = 0,86	F <sub>HEMA</sub> = 0,11 w <sub>HEMA</sub> = 0,14		
P(MMA-BA)40%	F <sub>MMA</sub> = 0,62 w <sub>MMA</sub> = 0,56		F <sub>BA</sub> = 0,38 w <sub>BA</sub> = 0,44	
P(MMA-BA-HEMA)	F <sub>MMA</sub> = 0,61 w <sub>MMA</sub> = 0,34		F <sub>HEMA/BA</sub> = 0,39 w <sub>HEMA/BA</sub> = 0,66	
P(MMA-BA-AA)	F <sub>MMA</sub> = 0,48 w <sub>MMA</sub> = 0,45		F <sub>BA</sub> = 0,36 w <sub>BA</sub> = 0,44	F <sub>AA</sub> = 0,16 w <sub>AA</sub> = 0,11

<sup>1</sup> EROLA *et al.* (2014) <sup>2</sup> CAMPOS *et al.* (2016) <sup>3</sup> VARGÜN *et al.* (2010)

As composições calculadas apresentaram grande semelhança com as frações alimentadas. Este fato pode ser melhor analisado na Figura 5.12, que apresenta uma comparação gráfica da fração de MMA calculada no copolímero como função da fração de MMA alimentada no reator. A figura permitiu confirmar que as composições dos copolímeros sintetizados estão de acordo com a alimentação de monômero carregada.

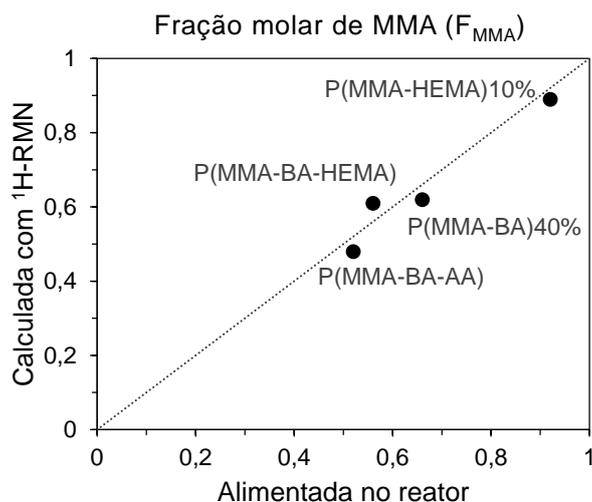


Figura 5.12. Comparação entre frações molares de MMA alimentadas no reator e a calculadas com base nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN dos copolímeros investigados. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

Com a incorporação de BA confirmada por RMN, a modificação de comportamento térmico pela inserção do BA foi investigada por meio das análises de DSC e TGA dos materiais. A Figura 5.13-A e a Figura 5.13-B apresentam os termogramas de TGA dos copolímeros contendo BA, e comparadas à do homopolímero PMMA. Os copolímeros apresentaram perfil de perda de massa abrupto, indicando único degrau de decomposição. A análise de derivada de massa confirmou essa tendência com um pico único e estreito na faixa de 380 - 397 °C para todos os copolímeros de BA (Figura 5.13-B). Enquanto o PMMA pode apresentar dois picos de degradação entre 180-350 °C e 350-400 °C (PETERSON *et al.*, 1999), o PBA exibe um pico em 407 °C (DE LA FUENTE *et al.*, 2001), o que explica a presença de sinal único ligeiramente deslocado para temperaturas superiores nos copolímeros.

A análise de DSC também permitiu inferir acerca da copolimerização. A redução de Tg é associada ao aumento da fração molar de BA na composição polimérica e também pode ser observada em casos de terpolímero (PAROUTI *et al.*, 2003). O deslocamento do ponto de inflexão da curva de DSC para temperaturas menores foi notável para os copolímeros contendo BA (Figura 5.13-C). Enquanto o PMMA apresentou Tg de 113,77 °C, os copolímeros apresentaram valores menores que 50 °C, comprovando a copolimerização bem-sucedida e consequente modificação do valor da Tg da

nanopartícula. Contudo, cabe ponderar que dificuldades foram encontradas para a medição da Tg para alguns materiais. Réplicas das análises precisaram ser realizadas, pois algumas incongruências dos valores de Tg foram observadas (Apêndice 6). As análises dos cromatogramas e os valores obtidos sugerem heterogeneidade da amostra e da técnica de amostragem, que podem impactar nos valores de Tg calculados. A Tabela 5.5 apresenta uma comparação entre a Tg observada e a Tg teórica calculada conforme regra da atividade e equação de FOX (Apêndice 7) (CANEVAROLO JR., 2006).

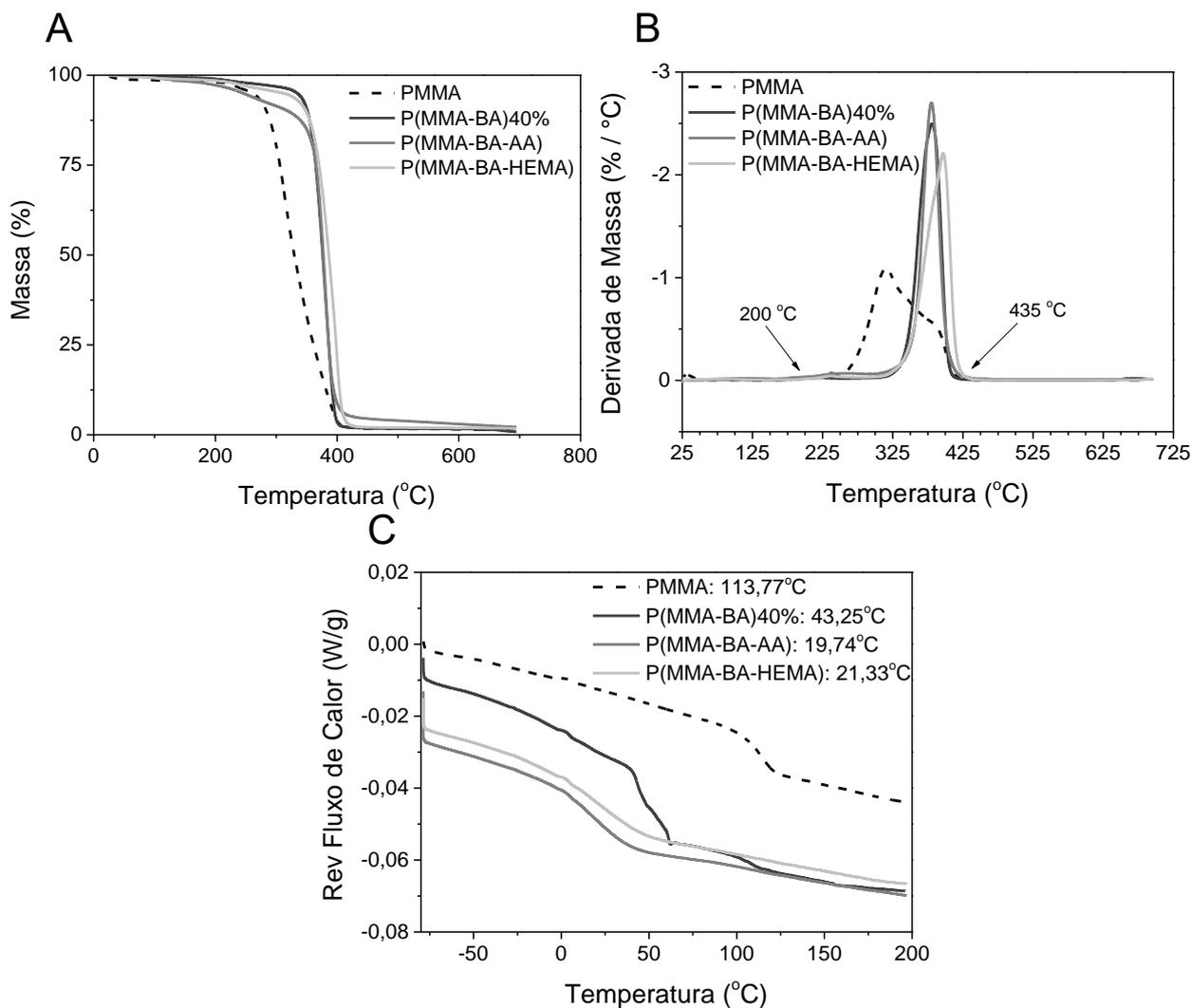


Figura 5.13. Análises térmicas realizadas para PMMA e copolímeros contendo BA. A - Termograma de TGA de perda de massa, B- Derivada de perda de massa de TGA, e C- curvas de DSC com os valores de Tg calculados. Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS, com exceção da reação P(MMA-HEMA), conduzida com 5% m/m HLB8 + 30% SDS.

Tabela 5.5. Temperaturas de transição vítrea do PMMA e dos copolímeros contendo BA calculadas pela equação de Fox, regra de aditividade e obtida experimentalmente pelo termograma de DSC.

Amostra	Tg (°C)	Tg (°C)	Tg (°C)
	Equação de Fox	Regra da aditividade	Espectro DSC
PMMA	105,00	105,0	113,8
P(MMA-BA)40%	32,0	52,5	43,3
P(MMA-BA-HEMA)	32,9	54,0	21,3
P(MMA-BA-AA)	27,0	47,2	19,7

Os valores experimentais de Tg indicaram pequena divergência com os valores teóricos propostos. A Tg do PMMA foi superior ao valor da literatura; por isso, esperava-se que as estimações baseadas no valor da literatura pudessem se afastar um pouco do valor experimental para os copolímeros. Outro ponto a considerar é a faixa de valores de Tg que são intrínsecas ao material. O homopolímero de PAA, por exemplo, pode apresentar Tg variando de 105 a 125 °C devido à taticidade (MAURER *et al.*, 1987). Por isso, a discrepância observada entre os valores preditos e observados não foram consideradas significativas. A ausência de uma tendência comum pode, inclusive, explicar os resultados diferentes entre replicatas de caracterização, confirmando a heterogeneidade de amostra. De forma geral, contudo, pode-se afirmar que a modulação de Tg foi possível a partir da copolimerização de MMA com BA.

Os impactos da copolimerização com BA foram visíveis também durante a caracterização por MEV. A Figura 5.14 exibe as micrografias encontradas para o homopolímero PMMA e os copolímeros com BA. Ao contrário das nanopartículas esféricas observadas para PMMA (Figura 5.14- A), as imagens dos copolímeros (Figura 5.14- B, C e D) mostraram superfícies lisas com poucas irregularidades, indicando a presença de filmes poliméricos, impossibilitando a visualização das nanopartículas. Entretanto, a técnica de espalhamento de luz detectou estruturas de tamanho nanométricos com alta confiabilidade para esses materiais. Então, suspeita-se que esses copolímeros

apresentem elevada sensibilidade térmica, o que inviabiliza a realização desta análise microscópica.

De fato, é conhecido que a visualização de materiais poliméricos por MEV pode ser comprometida, devido a sensibilidade do material ao dano pelo feixe de elétrons do equipamento (SAWYER; GRUBB, 1996). Adicionalmente, uma etapa de recobrimento com material condutor é necessária, o que também pode causar destruição térmica da amostra (SAWYER; GRUBB, 1996). Assim, levando em consideração a redução drástica de Tg do material contendo BA, admitiu-se que esta característica tenha ressaltado a sensibilidade térmica do material à exposição de feixe de elétrons do MEV, resultando em fusão e destruição da estrutura nanométrica, inviabilizando a observação da estrutura particulada do copolímero obtido. Este fato pode também ser considerado uma evidência indireta da copolimerização bem-sucedida com BA.

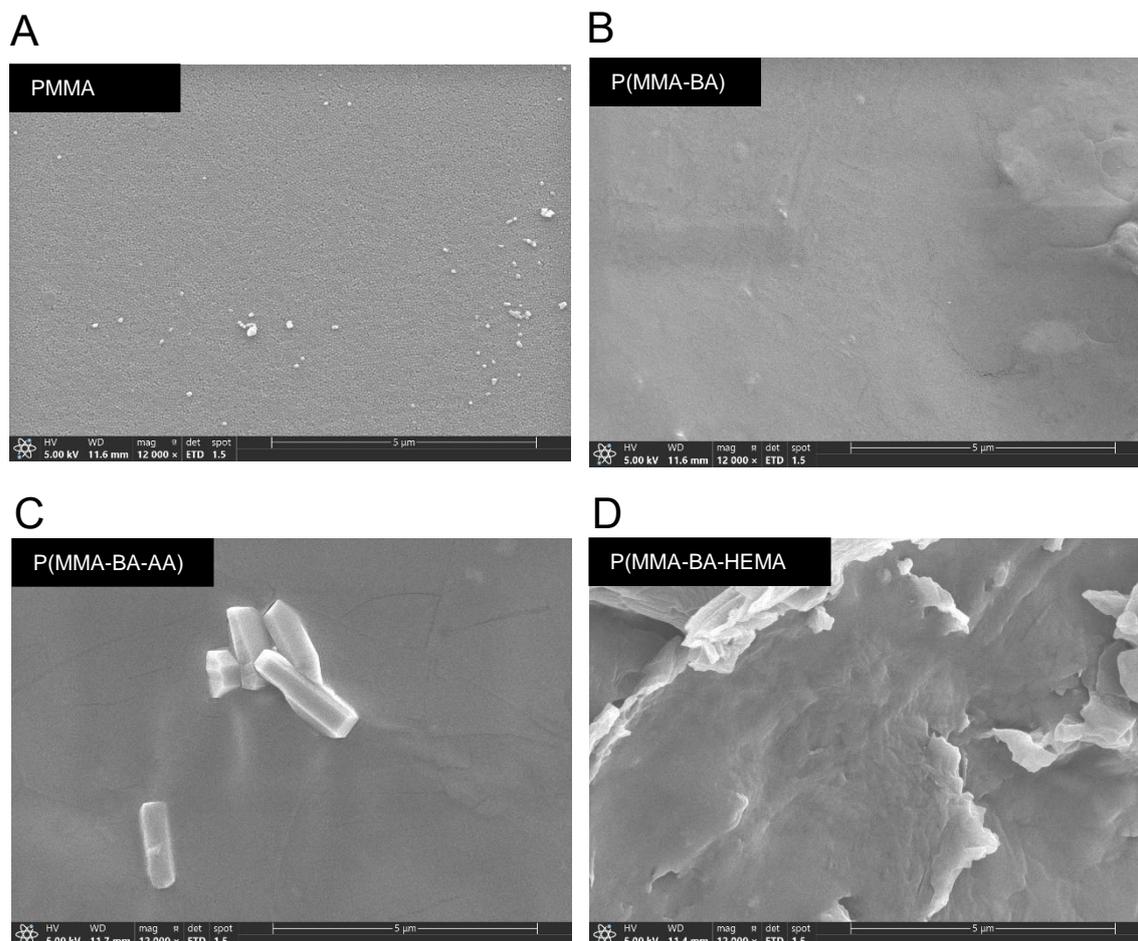


Figura 5.14. Micrografias eletrônicas de varredura no zoom 12000x para A - homopolímero PMMA, B - P(MMA-BA), C - P(MMA-BA-AA) e D- P(MMA-BA-HEMA). Todas as reações foram conduzidas com 5% m/m HLB6 + 30% SDS.

Os ensaios de copolimerização mostraram, portanto, a introdução satisfatória de novas funcionalidades na cadeia de PMMA. A manutenção de cinética e diâmetro de partícula é bastante vantajosa, pois permite a fácil adaptação dos protocolos de homopolimerização para a copolimerização, resultando em nanopartículas com características físico-químicas de interesse. Outro ponto de notória importância é a incorporação dos comonômeros funcionais em proporção equivalente à alimentada no reator, o que possibilita uma previsibilidade do comportamento do nanomaterial. Dessa forma, concluiu-se que os ensaios de copolimerização foram bem-sucedidos e sem modificação dimensional significativa. Assim, a próxima etapa visou ao estudo do encapsulamento *in situ* de RBL em nanopartículas de copolímero.

### 5.3 Encapsulamento *in situ* de RBL em copolímeros funcionais

A Seção 5.1 mostrou que o encapsulamento de RBL em nanopartículas de PMMA pode ser facilmente executado com alta eficiência e mantém propriedades estruturais de interesse. Aqui, segue-se para os ensaios de encapsulamento *in situ* de RBL em copolímeros, buscando avaliar a influência da introdução do fármaco na síntese das nanopartículas. Resultados promissores para o encapsulamento de RBL e funcionalização de nanopartículas de P(MMA-AA) foram previamente descritos (MANGIA *et al.*, 2021), incentivando a consideração deste copolímero nos ensaios conduzidos no presente estudo. O resultado insatisfatório da imobilização de biomoléculas em P(MMA-HEMA), que será apresentado nas próximas seções, justificou a eliminação deste copolímero na análise de encapsulamento de fármaco. Dessa forma, objetivou-se produzir nanopartículas com potencial de funcionalização e que sejam carreadoras do fármaco.

A Figura 5.15 apresenta as trajetórias de conversão de monômero obtidas para as reações de encapsulamento *in situ* de RBL nos copolímeros testados, usando o homopolímero PMMA\_R como controle. Em geral, as reações apresentaram resultados muito elevados de conversão (acima de 95%) ao final das 2 horas, indicando que o fármaco não afetou de forma significativa a polimerização dos copolímeros. Este fato é de extrema relevância e vantagem, visto que há evidências de que fármacos podem limitar a polimerização (OLIVEIRA *et al.*, 2011, 2012a). Uma exceção de desempenho foi observada para a condição P(MMA-AA)10%\_R.

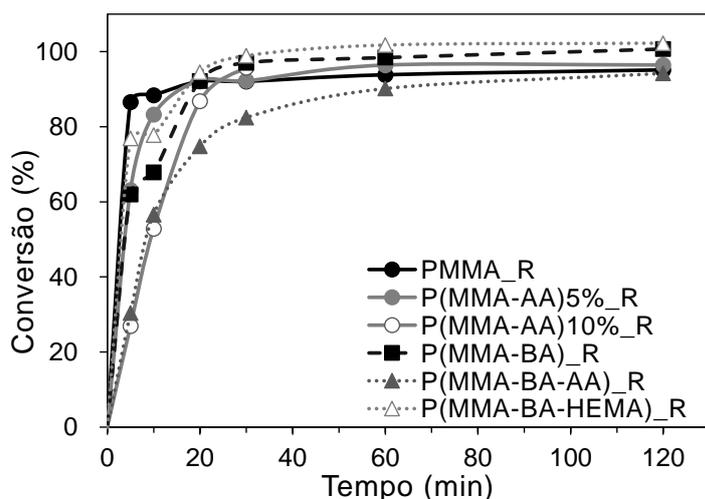


Figura 5.15. Cinética de conversão para os ensaios de encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL em copolímeros por polimerização em miniemulsão.

O copolímero P(MMA-AA)10%\_R apresentou perda de estabilidade de reação com expressiva aglomeração após 30 minutos de reação (Figura 5.16). Essa relação indesejada entre AA e RBL já foi identificada previamente (MANGIA *et al.*, 2021). Os autores associaram o uso conjunto de iniciador e monômero hidrofílicos com a polimerização de AA na fase aquosa e a síntese de *hairy particles*, que resultaram na redução do encapsulamento de RBL e na polimerização em massa, quando AA foi usado em maior concentração (MANGIA *et al.*, 2021). Além do iniciador hidrofílico, o uso de Tween80 pode também ter influenciado a solubilidade do AA na fase orgânica, como já observado anteriormente para RBL. Como o mesmo alterou a distribuição de RBL no meio orgânico, estima-se que o mesmo possa também influenciar a partição de AA no meio. Assim, com maior disponibilidade na fase aquosa, a polimerização pode ocorrer na fase aquosa e resultar na perda de estabilidade da miniemulsão. A ausência de nanoestrutura inviabilizou a consideração dessa condição de síntese nos futuros ensaios da tese e impôs a redução mássica de AA para 5 %m/m, nomeado como P(MMA-AA)5%\_R. Por isso, todas as referências futuras “P(MMA-AA)\_R” são menções ao copolímero com 5 %m/m de AA.



Figura 5.16. Aglomeração e perda de estabilidade da reação de encapsulamento *in situ* com copolímero de MMA e AA, nomeado P(MMA-AA)10%\_R.

O mecanismo reacional pode ser investigado a partir da análise da evolução do diâmetro médio de partícula, apresentada na Figura 5.17. Assim como observado para o controle PMMA\_R, a sobreposição de curvas de distribuição de tamanho indicou a manutenção de tamanho de gota ao longo da reação. Isto sugere um mecanismo de nucleação homogênea, que é característico da polimerização em miniemulsão (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). As curvas também apresentaram padrão monomodal estreito, o que indica que a dispersão de tamanhos não foi larga, sendo essa uma vantagem importante para o controle do processo. A Tabela 5.6 exibe o diâmetro médio, o índice de polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas obtidas ao final das 2 horas de reação.

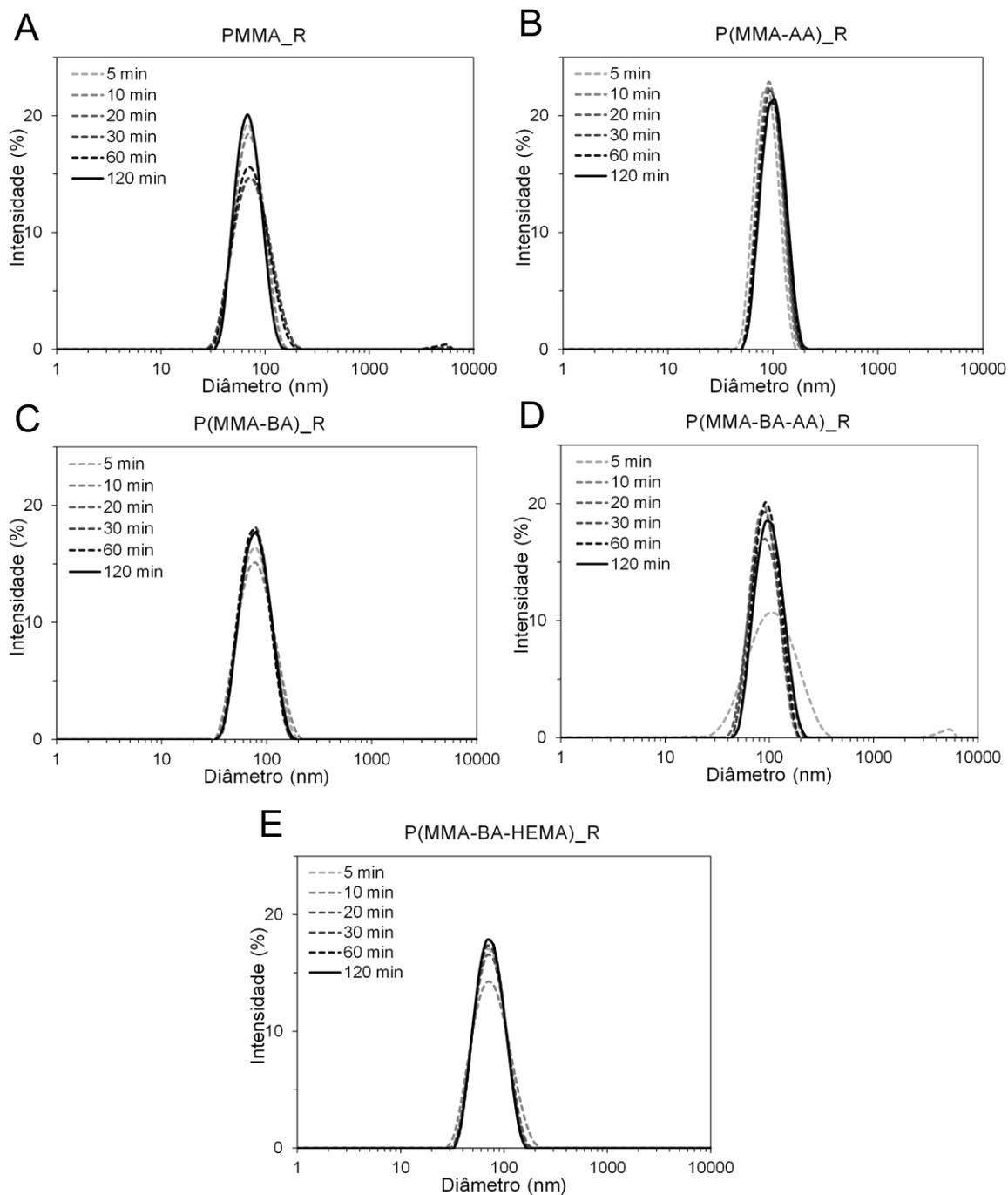


Figura 5.17. Distribuições de tamanhos de partícula ao longo das 2 horas de reação em miniemulsão para os ensaios de encapsulamento *in situ* de 0,5% de RBL para os copolímeros: A- PMMA\_R, B- P(MMA-AA)\_R, C- P(MMA-BA)\_R, D- P(MMA-BA-AA)\_R e E- P(MMA-BA-HEMA)\_R.

Tabela 5.6. Diâmetros médios de partícula, índices de polidispersão (PDI), potenciais zeta e eficiências de encapsulamento de RBL nas nanopartículas de copolímero sintetizadas por meio de encapsulamento *in situ* em miniemulsão.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro de Partícula (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Eficiência de Encapsulamento (%)</b>
PMMA_R	66,1	0,06	-48,9	89,4
P(MMA-AA)_R	88,9	0,06	-44,6	34,8
P(MMA-BA)_R	74,6	0,07	-58,5	89,9
P(MMA-BA-HEMA)_R	69,3	0,08	-54,7	58,5
P(MMA-BA-AA)_R	95,2	0,07	-57,5	56,4

Os resultados de diâmetro de partícula médio mostram que foi possível produzir partículas poliméricas com tamanho nanométrico para todos os copolímeros avaliados. Um pequeno aumento do tamanho médio de partícula (de até 30%) foi observado para as condições contendo AA. Isto pode resultar da formação de *hairy particles* ou pode ter relação com a incompatibilidade encontrada entre AA e RBL, que pode alterar a estabilidade de gota e, logo, o tamanho de partícula obtido. Entretanto, como todos os diâmetros obtidos ainda estão na faixa de interesse (menores que 100 nm), esse aumento não foi considerado inconveniente para a finalidade proposta nesta tese. Além disso, os valores de PDI obtidos encontram-se muito próximos do valor considerado altamente monodisperso (PDI =0,05) (DANA EI *et al.*, 2018), indicando elevada uniformidade de tamanhos de partícula, o que constitui um interessante padrão de qualidade.

Em relação ao potencial zeta, quando se comparam os valores encontrados para os copolímeros brancos (sem fármaco encapsulado - Tabela 5.2), nenhuma alteração significativa foi encontrada para os copolímeros com RBL encapsulada. Isso indica que o fármaco não apresenta influência na composição de superfície da partícula, o que pode ser considerado como um indicativo de internalização do mesmo na matriz polimérica. Os valores negativos foram, portanto, novamente associados aos surfactantes empregados e ao iniciador.

Já os valores encontrados para a eficiência de encapsulamento claramente indicam a influência do copolímero na internalização do fármaco na nanopartícula. Enquanto o polímero padrão (PMMA) apresentou alta eficiência de encapsulamento, chegando a quase 90%, os copolímeros, em especial aqueles contendo monômeros ácidos (AA e

HEMA), apresentaram valores inferiores, com máximo de 59%. A relação inversa entre a concentração de AA e a eficiência de encapsulamento de RBL já foi previamente citada e discutida na literatura (MANGIA *et al.*, 2021). Portanto, pode-se concluir que a inserção de comonômeros ácidos impactaram o encapsulamento de RBL. Isto pode ter relação com a mudança de pH local e a solubilidade do fármaco na fase orgânica.

O pH apresenta expressiva interferência na solubilidade, concentração de espécies ionizáveis e biodisponibilidade de fármacos, especialmente para moléculas consideradas ácidos ou bases fracas (AKULA; LAKSHMI, 2018). A RBL pode ser avaliada como uma base fraca, devido ao seu valor baixo de  $pK_a = 8,8$  (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022). No caso de uma base fraca, o pH apresenta influência inversa na solubilidade na fase aquosa (AKULA; LAKSHMI, 2018). Assim, em caso de redução de pH provocado pela inserção de comonômeros ácidos, pode-se aumentar a solubilidade de RBL na fase aquosa, justificando o seu menor encapsulamento. Por isso, valores baixos de encapsulamento foram obtidos para o copolímero P(MMA-AA)\_R (34,8%). Contudo, o comonômero BA não apresenta esse caráter ácido, possibilitando altas eficiências de encapsulamento para P(MMA-BA)\_R (89,9%), comparáveis aos do homopolímero padrão (89,4%). Isto justifica o melhor resultado do terpolímero P(MMA-BA-AA)\_R (56,4%) em relação ao copolímero P(MMA-AA)\_R (34,8%). Assim, conclui-se que a combinação de BA e AA foi muito relevante para aumentar a eficiência de encapsulamento da RBL em materiais que apresentam grupos ácidos.

A composição dos copolímeros carreadores de RBL foi investigada com auxílio de diferentes técnicas de caracterização. Tendo em vista que os espectros FTIR dos copolímeros e homopolímeros placebos foram muito semelhantes e não conclusivos (Figura 5.10), optou-se por avaliar a copolimerização somente por RMN. A Figura 5.18 apresenta os espectros  $^1\text{H}$ -RMN, assinalando as regiões utilizadas para análise de copolimerização.

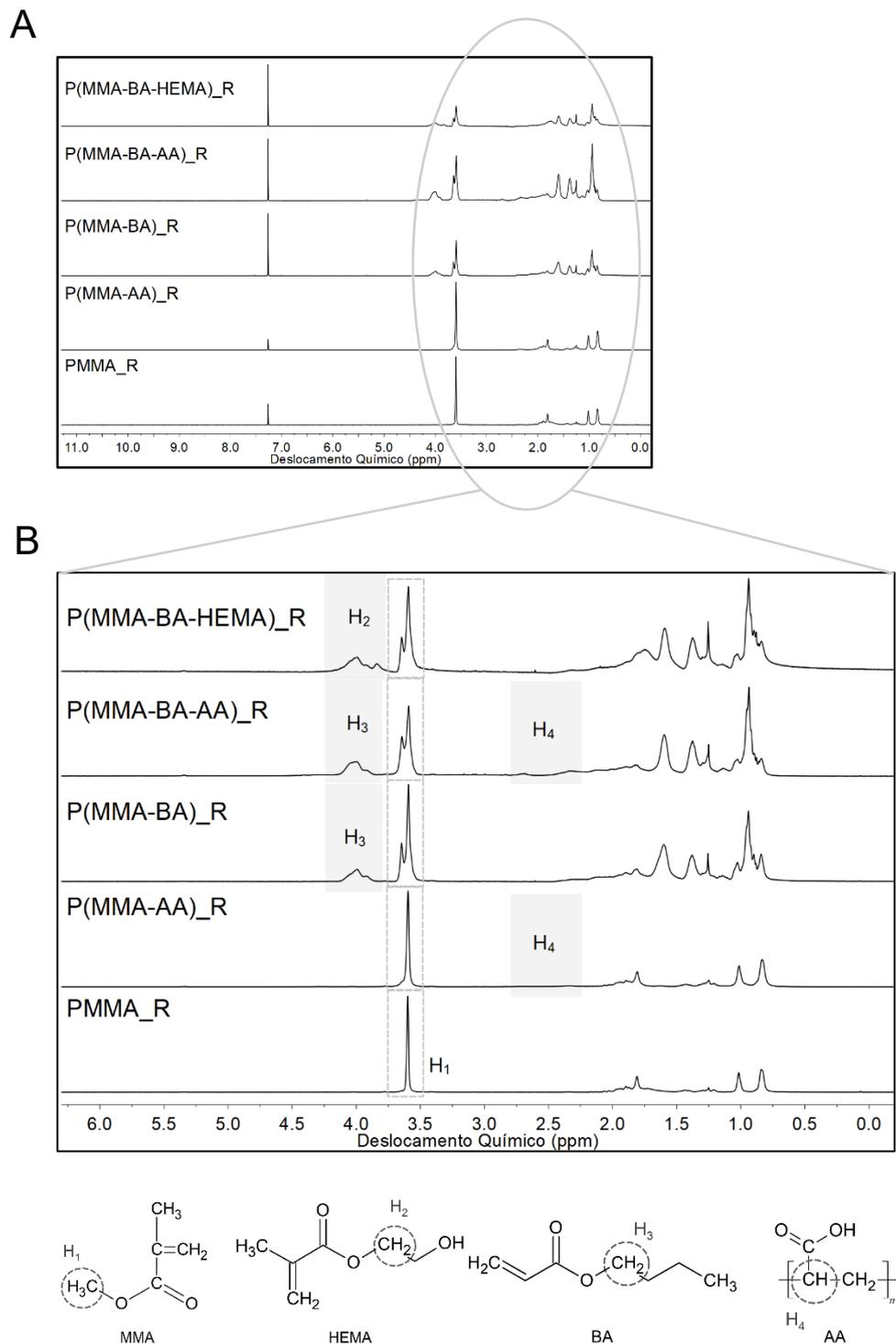


Figura 5.18. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN obtidos para os copolímeros com fármaco encapsulado. A- Espectro completo. B- Zoom na região de análise de copolimerização.

A Figura 5.18-A permitiu identificar o sinal associado ao solvente deuterado ( $\delta=7,2$  ppm) e a região de análise de copolimerização (entre  $\delta= 4,2 - 2,3$  ppm). Novamente, não foi observado duplete em  $\delta=5,2-5,7$  ppm associado aos monômeros. A Figura 5.18-B indica as regiões de análise para avaliação de copolimerização. Os sinais característicos do PMMA ( $\delta=3,6$  ppm do éster O-CH<sub>3</sub>;  $\delta=1,6-2,0$  ppm do grupo metileno e  $\delta=0,8-1,0$  ppm do grupo metila) foram observados para todos os copolímeros (CAMPOS *et al.*, 2016; EROLA *et al.*, 2015; VARGÜN *et al.*, 2010). Novamente, não foi possível separar as contribuições relativas do HEMA e do BA, sendo portanto usada a região do sinal  $\delta=4,2$  ppm relativo à ligação O-CH<sub>2</sub> para ambos os materiais (EROLA *et al.*, 2015; VARGÜN *et al.*, 2010) e  $\delta=2,3-2,6$  ppm para cálculo de incorporação de AA (CAMPOS *et al.*, 2016). Analogamente ao resultado do material PMMA\_R (Figura 5.4), nenhum sinal correspondente à estrutura do fármaco foi observado, podendo-se associar esse comportamento à baixa concentração utilizada (MANGIA *et al.*, 2021).

Os cálculos de copolimerização seguiram as fórmulas descritas no Apêndice 5, conforme já explicitado anteriormente. Os resultados de incorporação de monômeros estão dispostos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Composições molares ( $F_i$ ) e mássicas ( $w_i$ ) dos copolímeros com fármaco encapsulado, de acordo com os cálculos realizados com base nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN.

<b>Amostra</b>	<b>MMA</b> $\delta = 3.3-3.75$ ppm <sup>1</sup>	<b>HEMA</b> $\delta = 4.2$ ppm <sup>3</sup>	<b>BA</b> $\delta = 3.8-4.10$ ppm <sup>1</sup>	<b>AA</b> $\delta = 2.3-2.6$ ppm <sup>2</sup>
P(MMA-AA)_R	$F_{MMA} = 0,88$ $w_{MMA} = 0,91$			$F_{AA} = 0,12$ $w_{AA} = 0,09$
P(MMA-BA)_R	$F_{MMA} = 0,65$ $w_{MMA} = 0,59$		$F_{BA} = 0,35$ $w_{BA} = 0,41$	
P(MMA-BA-HEMA)_R	$F_{MMA} = 0,61$ $w_{MMA} = 0,34$		$F_{HEMA/BA} = 0,39$ $w_{HEMA/BA} = 0,66$	
P(MMA-BA-AA)_R	$F_{MMA} = 0,49$ $w_{MMA} = 0,46$		$F_{BA} = 0,37$ $w_{BA} = 0,44$	$F_{AA} = 0,14$ $w_{AA} = 0,10$

<sup>1</sup> EROLA *et al.* (2014) <sup>2</sup> CAMPOS *et al.* (2016) <sup>3</sup> VARGÜN *et al.* (2010)

Um comparativo gráfico entre a fração de MMA calculada no copolímero e fração alimentada de reação é apresentado na Figura 5.19. Os resultados indicam grande correlação entre as composições calculadas e as alimentadas para todos os copolímeros sintetizados com fármaco no meio. Uma pequena disparidade foi observada para P(MMA-BA-HEMA)\_R, que pode estar associada com o cálculo realizado, que soma as contribuições dos comonômeros. De forma geral, a introdução de RBL não afetou a copolimerização e a composição dos materiais formados, mostrando que a molécula é inerte na reação, o que permite a previsibilidade da estrutura do material produzido.

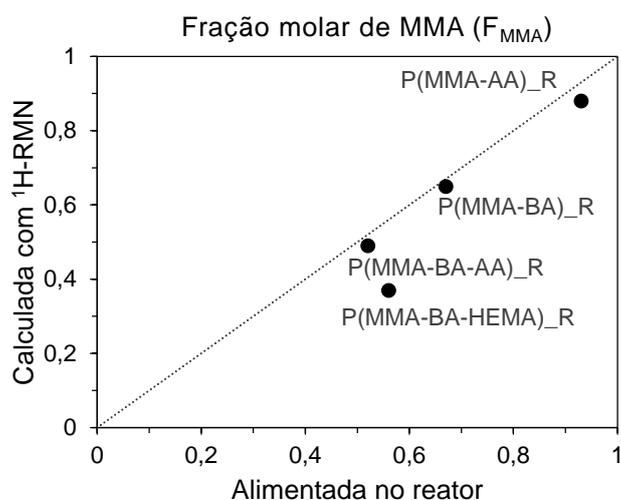


Figura 5.19. Comparação entre as frações molares de MMA alimentadas no reator e a calculadas com base nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN para os copolímeros com fármaco encapsulado.

Micrografias dos materiais (Figura 5.20) foram realizadas, com o objetivo de visualizar a forma e o tamanho das nanopartículas após o encapsulamento do fármaco. Assim como para o homopolímero controle (Figura 5.20 -A), nanopartículas esféricas de diâmetro nanométrico, semelhantes aos valores calculados com base na técnica de espalhamento de luz, foram também observadas para o copolímero P(MMA-AA)\_R (Figura 5.20 -B). Isto indicou que a metodologia de encapsulamento *in situ* em miniemulsão é adequada para síntese de copolímeros com nanoestrutura esférica e que o fármaco não influenciou significativamente os aspectos morfológicos da nanopartícula. Entretanto, não foi possível observar as esferas poliméricas quando o material apresentava BA em sua composição, conforme exemplificado pelas micrografias de P(MMA-BA)\_R e P(MMA-BA-AA)\_R.

A estrutura de filme retratada pelas micrografias sugere novamente fusão das partículas, em conformidade com o que já foi discutido anteriormente. Portanto, devido à sensibilidade térmica dos copolímeros contendo BA, a avaliação do formato das nanopartículas fica impossibilitada ao usar esta técnica de micrografia.

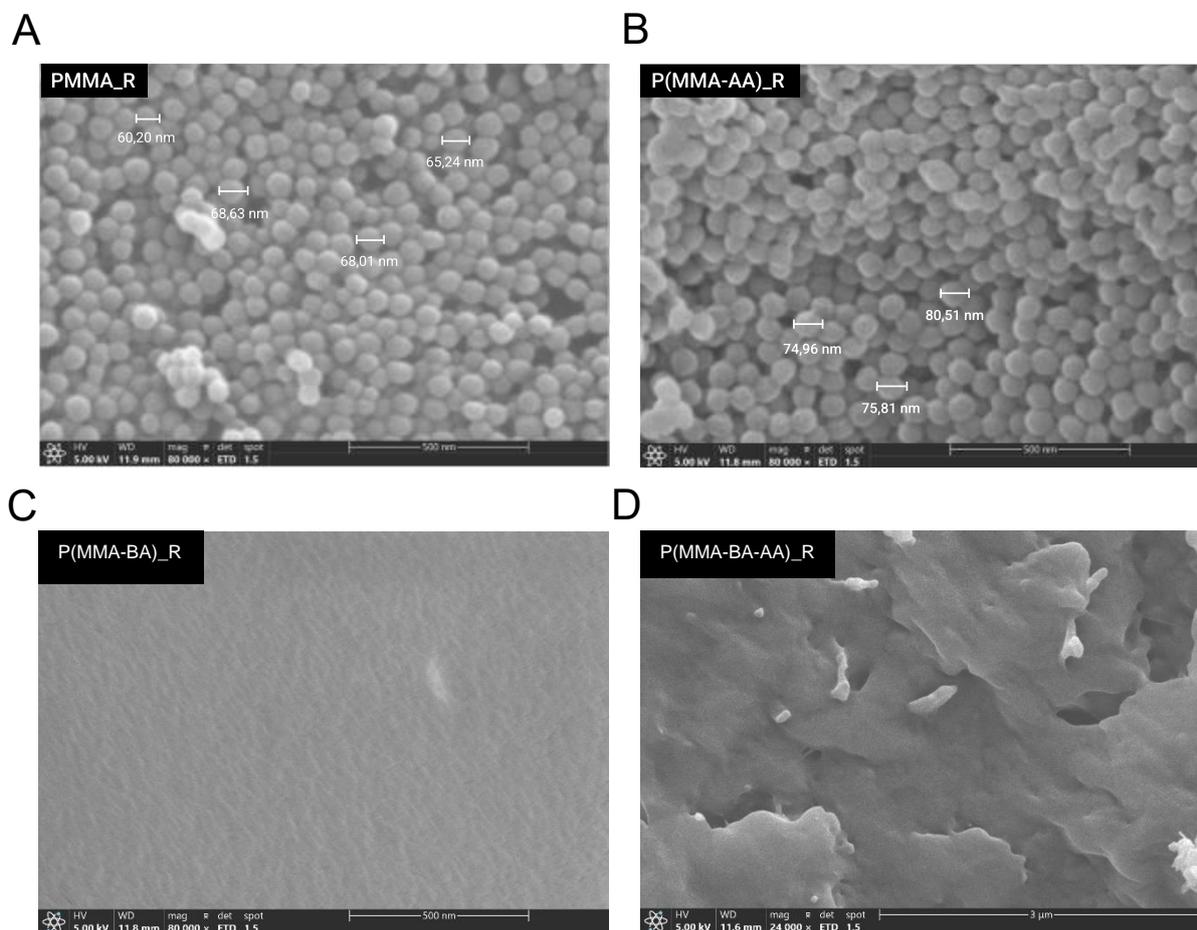


Figura 5.20. Micrografias eletrônicas de varredura de alguns copolímeros com fármaco encapsulado: A – PMMA\_R, B – P(MMA-AA)\_R, C- P(MMA-BA)\_R e D- P(MMA-BA-AA)\_R.

O comportamento térmico diferenciado das nanopartículas com RBL encapsulada foi analisado a partir de caracterizações de DSC. A Figura 5.21 apresenta a comparação dos espectros de DSC obtidos para os materiais com e sem fármaco encapsulado, sendo P(MMA-AA)\_R a única exceção, pois não possui placebo. De forma geral, a tendência de redução de Tg com a introdução de BA foi também observada para os materiais encapsulados. O uso de BA reduziu a Tg do material de 114,52 °C (PMMA\_R) para 54,28 °C (PMMA-BA\_R). Esse efeito pode ser comprovadamente associado ao BA, já que o

material PMMA-AA\_R também apresentou alto valor de Tg de 116,03 °C. Analisando a contribuição do fármaco sobre propriedade, nota-se uma predisposição a temperaturas maiores de intensidades muito divergentes. De forma semelhante à ocorrida para os materiais placebos, discrepâncias entre as repetições de caracterização foram observadas. Os valores integrais das repetições estão dispostos no Apêndice 6 e sugerem heterogeneidade de amostragem. Considerando que o fármaco pouco afetou as outras propriedades caracterizadas aqui, concluiu-se que essa pequena modificação de Tg não foi associada à presença de RBL.

A Tabela 5.8 apresenta os comparativos teóricos (calculados no Apêndice 7) e experimentais dos valores de Tg para os materiais encapsulados. Os resultados apresentaram boa proximidade com os valores teóricos pela regra da aditividade, sugerindo boa previsibilidade de propriedades. A discrepância com as previsões de Fox pode ter relação com a distribuição dos comonômeros na cadeia (BONARDELLI *et al.*, 1986), o que também explicaria os resultados divergentes de replicatas de caracterização. De forma geral, confirma-se que a modulação de Tg por meio da copolimerização com BA também foi possível para os materiais com fármaco encapsulado.

Estes resultados confirmaram que o fármaco encapsulado não modificou qualquer propriedade estrutural ou térmica dos copolímeros, o que é de muito interesse do ponto de vista de previsibilidade de propriedades do material. Apesar da eficiência de encapsulamento ser menor para os materiais contendo grupos ácidos, o terpolímero permitiu melhorar a eficiência de carregamento. De forma geral, o encapsulamento *in situ* possibilitou o simples encapsulamento do fármaco, mantendo as propriedades desejadas das nanopartículas testadas.

Tabela 5.8. Temperaturas de transição vítrea dos copolímeros com fármaco encapsulado calculada pela equação de Fox, regra da aditividade e pelo termograma de DSC experimental.

Amostra	Tg (°C)	Tg (°C)	Tg (°C)
	Equação de Fox	Regra da aditividade	Espectro DSC
PMMA_R	105,0	105,0	114,5
P(MMA-AA)_R	105,7	105,7	116,0
P(MMA-BA)_R	31,9	52,5	54,3
P(MMA-BA-HEMA)_R	27,0	47,2	44,5
P(MMA-BA-AA)_R	32,9	54,0	17,4

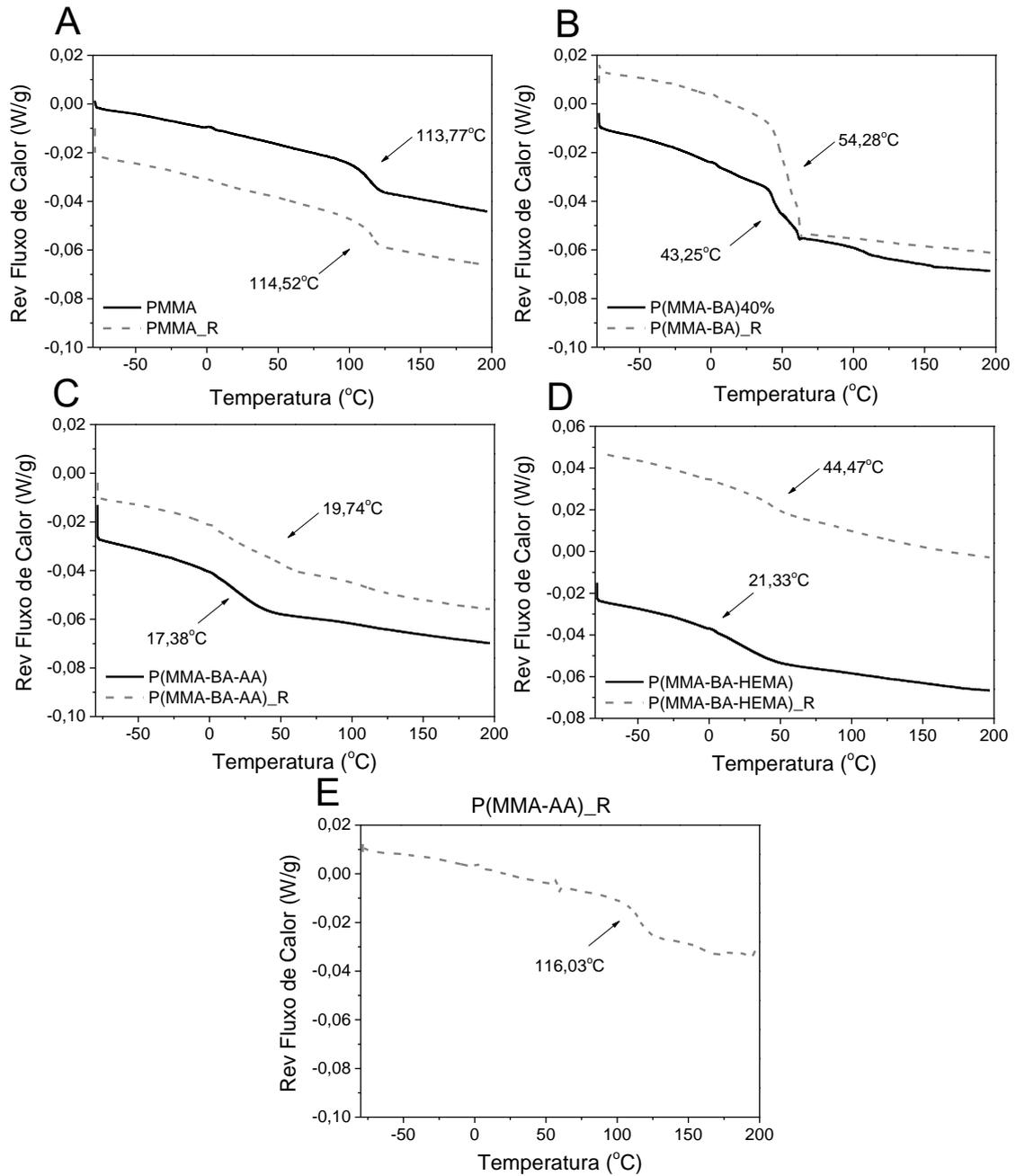


Figura 5.21. Termogramas de DSC para os copolímeros sem (linha contínua) e com (linha tracejada) fármaco encapsulado: A – PMMA e PMMA\_R, B – P(MMA-BA)40% e P(MMA-BA)\_R, C- P(MMA-BA-AA) e P(MMA-BA-AA)\_R, D- P(MMA-BA-HEMA) e P(MMA-BA-HEMA)\_R e D- P(MMA-AA)\_R.

## 5.4 Funcionalização das nanopartículas de copolímeros com biomoléculas

### 5.4.1 Funcionalização de copolímeros brancos com lisina

A Seção 2.4.3 apresentou a grande diversidade de biomoléculas que estão sendo estudadas para aumentar o direcionamento de nanopartículas ao cérebro. Fosfolipídios, peptídeos e proteínas podem ser adsorvidos fisicamente ou quimicamente na superfície dos nanossistemas utilizando mecanismos e reagentes de funcionalização diferentes. Estudos anteriores indicaram elevado potencial de adsorção física de proteínas em nanopartículas de copolímeros de PMMA (CAMPOS *et al.*, 2019), mas também elevada eficiência de adsorção química de biomoléculas utilizando reagente EDC (CAMPOS *et al.*, 2016; MANGIA *et al.*, 2021; WAY *et al.*, 2019). Por isso, procurou-se avaliar a metodologia de adsorção química utilizando lisina como biomolécula modelo e o reagente EDC, a fim de estudar a potencialidade de funcionalização dos nanocarreadores sintetizados, utilizando as nanopartículas de copolímeros brancos como partículas modelo.

Os resultados de eficiência de funcionalização estão dispostos na Tabela 5.9. Os valores de eficiência de funcionalização observados foram medianos (máximo de 60%). Isso teria relação com o excesso de massa de lisina utilizado, indicando que poderia ser utilizada uma quantidade menor de lisina no ensaio.

Notou-se que a nanopartícula controle de PMMA apresentou a menor eficiência de funcionalização (de 17%). Este resultado já era antecipado, visto que não era esperado que o PMMA apresentasse funcionalização química, devido à ausência de grupos funcionais para acoplamento químico. Assim, estima-se que o valor apresentado seja indicativo de processo de adsorção física de lisina na superfície da partícula. De fato, a existência de adsorção física de biomoléculas em PMMA já foi confirmada em ensaios anteriores (CAMPOS *et al.*, 2019; MANGIA *et al.*, 2021), indicando que é possível adsorver biomoléculas sem utilizar metodologias de acoplamento químico.

Tabela 5.9. Eficiência de lisina adsorvida em nanopartículas sem RBL e utilizando método EDC.

Amostra	Eficiência de lisina adsorvida
	Média $\pm$ desvio padrão (%)
PMMA	16,98 $\pm$ 4,42
P(MMA-HEMA)10%	29,76 $\pm$ 10,52
P(MMA-BA)40%	55,56 $\pm$ 11,72
P(MMA-BA-HEMA)	60,07 $\pm$ 13,70
P(MMA-BA-AA)	54,20 $\pm$ 10,57

O uso de copolímeros, entretanto, permitiu aumentar significativamente o percentual de aminoácido adsorvido. As eficiências saltaram de 17% para até 60%, sugerindo que uma quantidade considerável do aminoácido pode ser adsorvida pelos copolímeros. Contudo, entre os copolímeros, o material P(MMA-HEMA)10% apresentou a menor eficiência de adsorção.

Este resultado pode estar relacionado tanto com a metodologia de ação do EDC, atuante em terminais ácido carboxílico (COOH) que estão ausentes no HEMA, quanto à própria característica superficial de partículas P(MMA-HEMA). O poli(2-hidróxi etil metacrilato) (PHEMA) é considerado como um polímero hidrofílico com baixa tendência de adsorção proteica (ZHANG *et al.*, 2012); por isso, ele pode apresentar desempenho inferior, mesmo para adsorção física, quando comparado a outros polímeros. Por essa razão, este copolímero foi desconsiderado nos próximos ensaios da tese.

O BA tem sido recentemente estudado na literatura como material de revestimento e cobertura para aplicações biomédicas, inclusive na área de suportes para adsorção de biomoléculas, por conta das suas propriedades adesivas (AWSIUK *et al.*, 2019). Esta propriedade aderente explica, portanto, o resultado superior encontrado para o copolímero P(MMA-BA)40% em relação ao copolímero funcional P(MMA-HEMA)10%. Da mesma forma, a contribuição adesiva pode auxiliar na adsorção superficial de proteínas, resultando em eficiências de funcionalização superiores para materiais com BA (Tabela

5.9). De fato, o copolímero P(MMA-BA-HEMA) apresentou desempenho similar ao P(MMA-BA)40% e superior ao P(MMA-HEMA)10%, sugerindo grande contribuição do caráter adesivo do BA no desempenho do material como suporte de adsorção de biomoléculas.

Por fim, o terpolímero P(MMA-BA-AA) apresentou também um resultado comparável ao do P(MMA-BA-HEMA). Entretanto, espera-se que este material seja mais promissor para adsorção de biomoléculas, já que soma a contribuição adesiva do BA com a contribuição funcional de AA, que confere a possibilidade de adsorção química por reação com EDC (MANGIA *et al.*, 2021). Assim, este terpolímero apresenta grande potencialidade para ser usado como nanocarreador polimérico modificado com biomoléculas direcionais.

A adsorção de lisina também foi avaliada qualitativamente, a partir dos espectros de FTIR dos materiais após funcionalização (Figura 5.22). Após o processo de adsorção, os materiais apresentaram picos de leitura na região entre 1600 e 1645  $\text{cm}^{-1}$ , que estão associados à ligações N-H presentes em grupos amida (região entre 1660 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) (MARTÍNEZ-MANCERA; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2015; RIBEIRO; SOUZA, 2007). Portanto, a presença de bandas nessa região são indicativos de adsorção química de lisina ao material polimérico. As intensidades das bandas foram especialmente mais relevantes nos materiais com maior eficiência de adsorção, como P(MMA-BA-AA) e P(MMA-BA-HEMA). Esses resultados estão de acordo com a literatura e indicam que a intensidade do aumento de ligações associados a grupamentos amida está associada ao incremento de ligações deste tipo (MARTÍNEZ-MANCERA; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2015). Logo, quanto maior é a intensidade dessa absorção, maior é a eficiência de adsorção. Já os picos na região 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  são característicos dos grupamentos amina (CAMPOS *et al.*, 2016) presentes no aminoácido. Assim, a presença de picos nesta região também indica uma provável adsorção física do material.

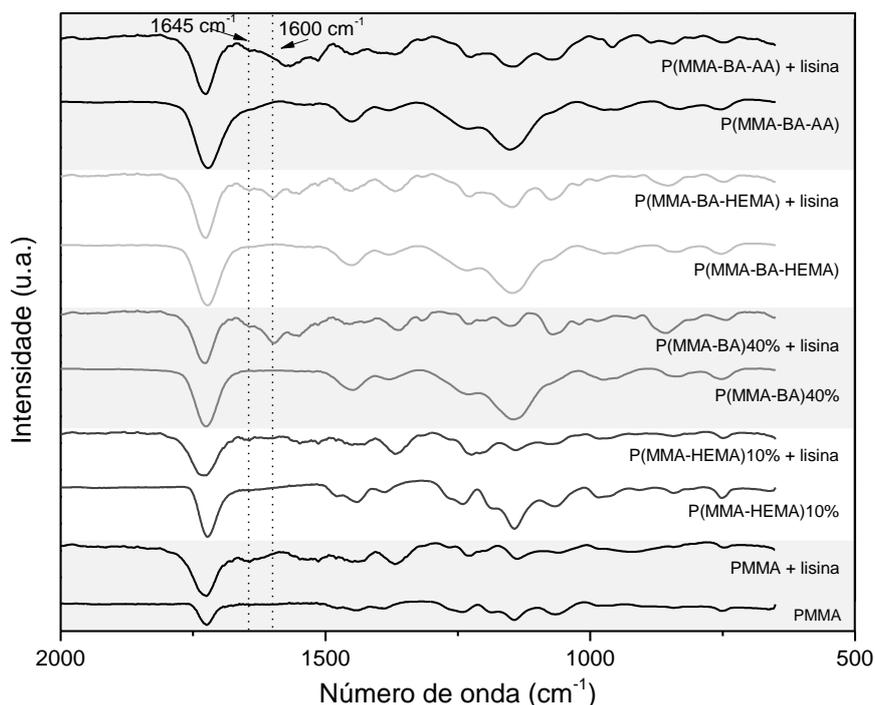


Figura 5.22. Comparação de espectros de FTIR para nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com lisina na região *fingerprint* entre  $2000\text{ cm}^{-1}$  e  $650\text{ cm}^{-1}$ .

Os resultados, então, evidenciaram que os materiais poliméricos apresentaram capacidade de adsorção física ou química do aminoácido, corroborando a propriedade da metodologia utilizada. O incremento da capacidade de adsorção foi especialmente observado nos copolímeros com BA, dadas as suas características adesivas e funcionais, destacando a elevada potencialidade das nanopartículas para modificação superficial com biomoléculas.

#### 5.4.2 Funcionalização de copolímeros funcionais contendo rivastigmina com biomoléculas

Anteriormente, foi mostrado que as nanopartículas poliméricas, em especial os copolímeros, apresentaram grande potencial de adsorção física ou química do aminoácido lisina com a metodologia testada. Buscou-se então constatar a viabilidade de funcionalização de nanopartículas carreadoras de rivastigmina base livre com biomoléculas de alta massa molar, como proteínas e hormônios. Para isso, foram usadas

a BSA com massa molar de  $\approx 66\text{kDa}$  (SIGMA-ALDRICH, 2022a), e a insulina recombinante, com massa molar de  $\approx 5,8\text{kDa}$  (SIGMA-ALDRICH, 2022b), a fim de avaliar o efeito do tamanho da biomolécula na imobilização.

A capacidade de funcionalização das nanopartículas foi avaliada por meio da eficiência de encapsulamento e da avaliação do diâmetro e potencial zeta de partícula, ambos expostos na Tabela 5.10. Os resultados observados foram muito elevados em termos de eficiência de adsorção ( $>90\%$ ), indicando adequabilidade do protocolo empregado e que o fármaco encapsulado não interferiu no processo de funcionalização. A BSA é uma proteína amplamente utilizada em estudos de bioconjugação (CAMPOS *et al.*, 2019; LI; LIU, 2005; WAY *et al.*, 2019) e os resultados encontrados sugerem um elevado potencial destas nanopartículas para adsorver biomoléculas, consistindo em um poderoso nanocarreador de fármacos *situ*-específica. A imobilização também foi confirmada por meio do aumento de diâmetro hidrodinâmico e da alteração de carga de superfície, indicada pelo potencial zeta (Tabela 5.10), evidenciando a presença das biomoléculas na superfície externa do nanomaterial.

Os copolímeros P(MMA-BA)<sub>R</sub> e P(MMA-BA-HEMA)<sub>R</sub> apresentaram uma pequena quantidade visível de corpo de fundo, sugerindo uma limitada aglomeração de partículas. Isto foi confirmado pelo aumento significativo do diâmetro de partícula exibido na Tabela 5.10. Contudo isso não aconteceu para os copolímeros contendo AA. De fato, entre todos os materiais testados, o PMMA-BA-AA<sub>R</sub> apresentou os melhores resultados de eficiência de funcionalização tanto para BSA quanto para insulina.

Tabela 5.10. Eficiências de funcionalização, diâmetros médios e potenciais zeta das partículas após bioconjugação.

	<b>Antes da funcionalização</b>	<b>BSA</b>		<b>Insulina</b>	
	Diâmetro (nm) e Potencial Zeta (mV)	Eficiência +- desvio padrão (%)	Diâmetro (nm) e Potencial Zeta médios (mV)	Eficiência +- desvio padrão (%)	Diâmetro (nm) e Potencial Zeta médios (mV)
P(MMA-AA)_R	98,7 -47,7	90,51 ± 2,00	106,6 -35,5	99,54 ± 0,24	134,5 -43,0
P(MMA-BA)_R*	74,6 -58,5	88,90 ± 5,92	511,8 -26,7	99,29 ± 0,26	2004,7 -41,1
P(MMA-BA-HEMA)_R*	69,3 -54,7	91,17 ± 3,15	410,6 -27,5	98,66 ± 0,45	2642,8 -37,3
P(MMA-BA-AA)_R	95,2 -57,5	95,86 ± 0,49	122,0 -37,9	100,01 ± 0,03	141,5 -43,6

\*visualização de um corpo de fundo.

É sabido que o uso de revestimento hidrofílico, promovido pelo AA, pode aliviar a tendência à aglomeração devido à formação de uma capa hidratada, que permite que as partículas fiquem separadas na suspensão (HERMANSON, 2008). Isto pode explicar a maior estabilidade dos ensaios com copolímeros contendo AA, que não apresentaram aglomeração visual e indicaram aumento controlado de tamanho de partícula (Tabela 5.10). Outra vantagem do comonômero AA é que a combinação de grandes cadeias carbônicas com monômeros carregados permite criar uma superfície híbrida com caráter hidrofóbico e áreas carregadas. Assim as biomoléculas podem interagir com o suporte tanto por interações hidrofóbicas quanto elétricas. Isso permite maior retenção da atividade da biomolécula e consequente atividade biológica (HERMANSON, 2008). Dessa forma, a introdução de AA permitiu não só aumentar a estabilidade da suspensão funcionalizada, como também espera-se conservar a atividade biológica da molécula, um ponto de extrema importância para garantir a sua funcionalidade como molécula de vetorização.

As nanopartículas também foram caracterizadas por FTIR para confirmação de bandas associadas à imobilização das biomoléculas. A Figura 5.23 apresenta os espectros de FTIR na região *fingerprint* para os materiais imobilizados com BSA e com insulina, respectivamente. Picos em 1660 e 1540  $\text{cm}^{-1}$  indicam estiramentos C=O e C-N de

grupos amidas (MARTÍNEZ-MANCERA; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2015) e estão presentes em  $1640$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$  para as partículas imobilizadas com BSA (Figura 5.23- A), e em  $1650$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$  para as nanopartículas funcionalizadas com insulina (Figura 5.23- B). Também foi observada grande sobreposição de bandas na região de  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  com as regiões de pico apresentadas pelas biomoléculas puras, BSA e insulina, indicando a presença dessas moléculas nas nanopartículas poliméricas. Portanto, pode-se concluir que o processo de adsorção foi eficiente.

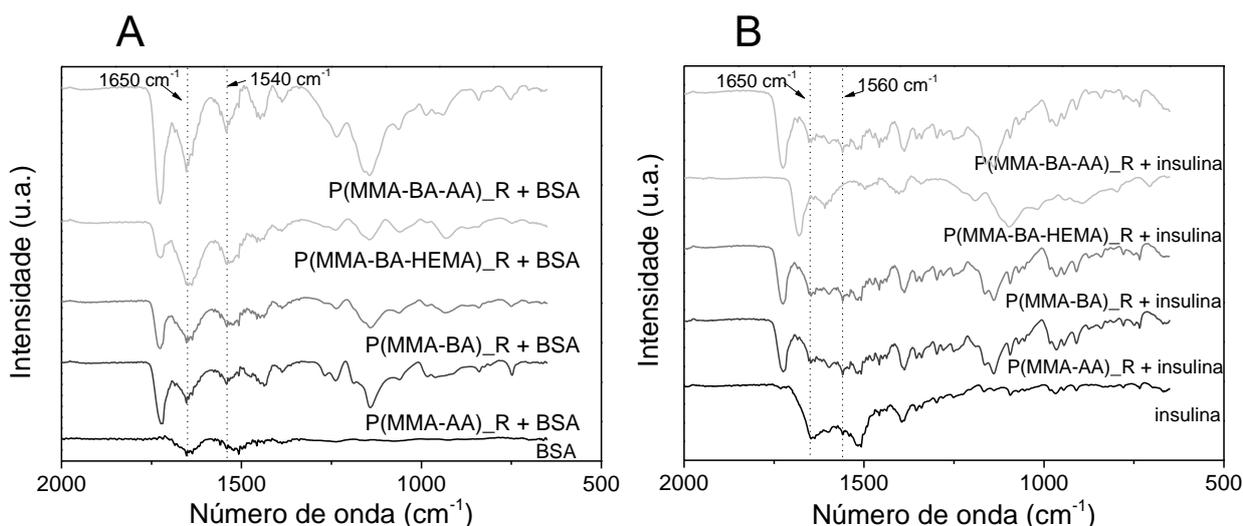


Figura 5.23. Espectros de FTIR na região *fingerprint* para as nanopartículas de copolímero carreadoras de rivastigmina e funcionalizadas com A- BSA e B- insulina.

Os resultados indicam o grande potencial dos nanomateriais preparados para a adsorção de proteínas e hormônios, expandindo o conjunto de moléculas biológicas que podem ser utilizadas para vetorização. O fármaco encapsulado não impactou o potencial de adsorção, o que é extremamente benéfico e contribui para potencializar o uso destes materiais como veículos de entrega dirigida ao cérebro, sem afetar na função de carreador de fármaco. Em especial, o material P(MMA-BA-AA)\_R apresentou um comportamento de destaque, pois as nanopartículas apresentaram elevada capacidade de adsorção de biomoléculas e estabilidade em suspensão, além de permitirem a introdução do comonômero BA, cuja funcionalidade será avaliada nos ensaios de liberação *in vitro* descritos na próxima seção.

## Capítulo 6. Ensaio de liberação *in vitro* de fármaco encapsulado e estudo de segurança de nanopartículas

Anteriormente, a síntese e a caracterização de nanopartículas de copolímeros carreadoras de fármaco foram discutidas. Nesta seção, as análises *in vitro* destes nanocarreadores são apresentadas e discutidas.

### 6.1 Ensaio de liberação *in vitro*

Sabe-se que a cinética de liberação apresenta informações importantes para avaliação da segurança, qualidade e eficácia de um nanocarreador. Entretanto, não existem padrões regulatórios para testes de liberação *in vitro* de nanoformulações até o momento (D’SOUZA, 2014). Por isso, além do estudo e avaliação da cinética de liberação, a determinação de um protocolo de ensaio de liberação constituiu um desafio significativo para este trabalho.

#### 6.1.1 Desenvolvimento de um protocolo experimental para ensaio de liberação *in vitro* de RBL encapsulada em nanopartículas poliméricas

O protocolo experimental deve considerar a via de administração/ação da formulação, manter a solubilidade e estabilidade do fármaco, possibilitar métodos analíticos adequados, simular condições *in vivo* e deve adaptar a instrumentação para nanossistemas (D’SOUZA, 2014). Por isso, devido à elevada complexidade do protocolo experimental, optou-se por realizar um levantamento bibliográfico especialmente focado no estudo de liberação de RBL.

Órgãos nacionais e internacionais conhecidos por suas competências em função da criação de normas e diretrizes aplicadas na indústria farmacêutica, bem como a literatura científica, foram consultados para definição da metodologia experimental adequada. A Figura 6.1 apresenta um esquema representativo das tomadas de decisões realizadas nesta etapa.

Segundo o levantamento realizado no presente trabalho, a Farmacopeia Brasileira (FB) não apresenta qualquer registro de protocolos validados para “rivastigmina” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019). Logo, foram buscadas

outras fontes de referência internacional. A Farmacopeia Americana (USP) apresenta protocolos de dissolução apenas para cápsulas de TR (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2022), que, como já comentado anteriormente, apresenta propriedades físico-químicas diferentes da RBL. Já o FDA, além das cápsulas do sal, também descreve metodologias de ensaio para a formulação transdérmica do fármaco (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022) que, apesar de conter RBL, conta com especificações próprias como aparelhagem e meio específicos, que diferenciam do propósito de aplicação da presente pesquisa. Por isso, optou-se por investigar a literatura científica especializada em encapsulamento e liberação de RBL.

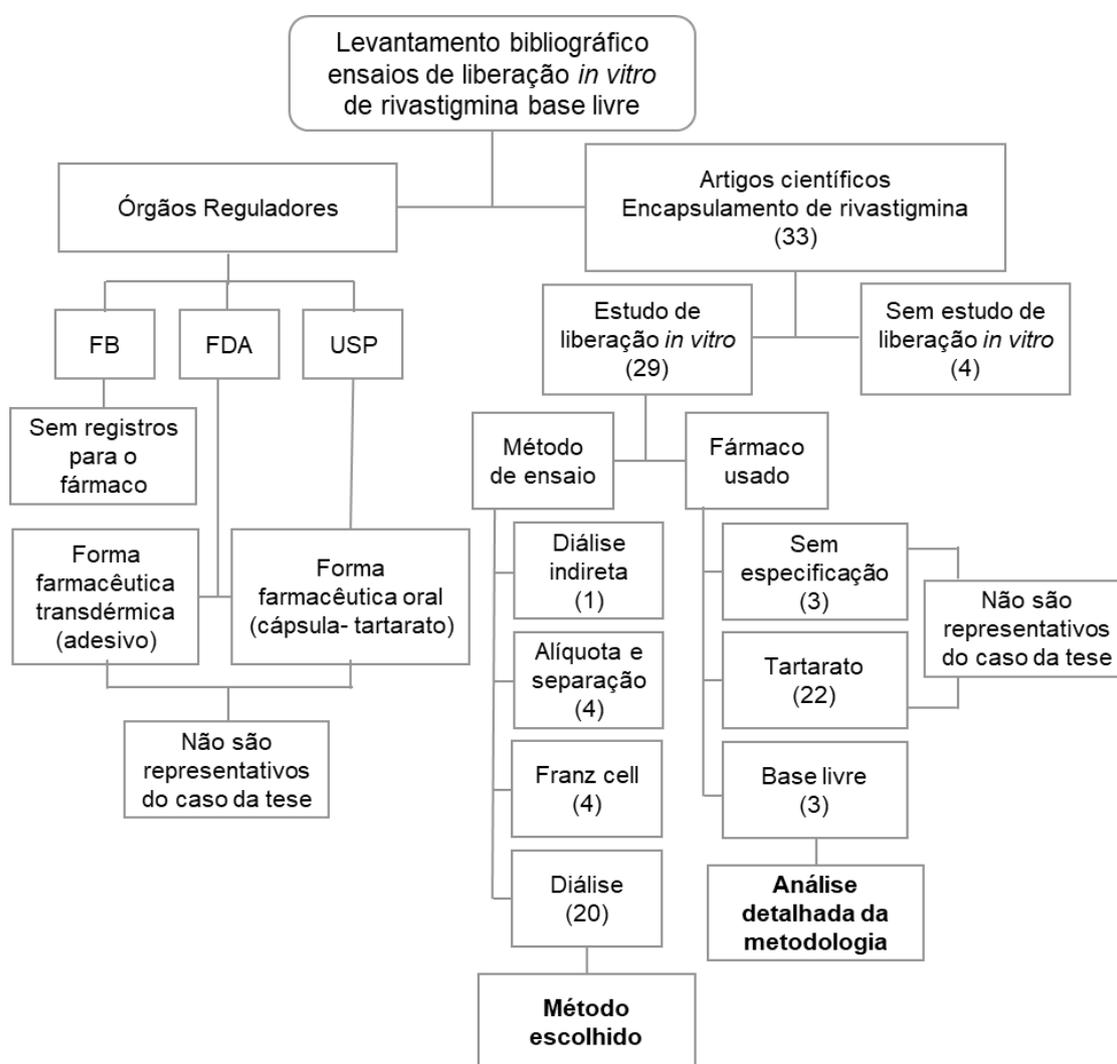


Figura 6.1. Esquema representativo das etapas decisórias realizadas durante levantamento bibliográfico para o desenvolvimento de um protocolo experimental para análise de liberação *in vitro* de RBL.

Como já indicado no Capítulo 2. , a literatura de encapsulamento de rivastigmina é escassa. Entretanto, os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados por 88% dos trabalhos analisados, reforçando a importância desta avaliação na produção de uma nova tecnologia farmacêutica. O principal método de ensaio de liberação utilizado é o da membrana de diálise, representando 69% dos estudos de liberação. Contudo, apenas 10% dos trabalhos realizaram ensaios especialmente com RBL; ou seja, apenas 3 trabalhos, dificultando a consulta de um protocolo experimental abrangente. As condições experimentais destes estudos estão resumidas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Levantamento das condições experimentais utilizadas por artigos científicos que estudaram ensaio de liberação *in vitro* de RBL encapsulada em nanopartículas.

<b>Método do ensaio <i>in vitro</i></b>	<b>Equipamento</b>	<b>Volume e meio</b>	<b>Tempo e temperatura</b>	<b>Método de quantificação</b>
Membrana de diálise (MOHAMADPOUR <i>et al.</i> , 2020)	Shaker	5 mL Tampão PBS pH 7,4	37 °C 18h	HPLC
Alíquota e separação (HEMMATI <i>et al.</i> , 2016)		100 mL Tampão PBS pH 2,2/7,4/9,0	37 °C 7 dias	Espectrofotômetro UV
Alíquota e separação (CRAPARO <i>et al.</i> , 2008)	Banho maria	8 mL Tampão PBS pH 7,4 e plasma sanguíneo	37 °C 24h	HPLC

A divergência das condições experimentais entre os trabalhos enfatiza a grande dificuldade de obter um protocolo universal. Um ponto notório foi a ausência de equipamentos padronizados para os ensaios de liberação, expondo uma lacuna expressiva no campo de avaliação de liberação de nanossistemas. Assim, é indispensável desenvolver um protocolo de ensaio para liberação de RBL utilizando equipamento padronizado para criar condições de ensaio comparativas. Por isso, as ações representadas na Figura 6.1 contribuíram não só com o desenvolvimento de um protocolo experimental para avaliar os resultados da tese, como também pretenderam reduzir a lacuna de conhecimento e informação acerca de ensaios de liberação *in vitro* padronizados para nanopartículas.

O protocolo desenvolvido buscou atender ao máximo às metodologias já descritas na literatura e adotadas por órgãos de referência. Por isso, foi escolhido utilizar o

equipamento dissolutor equipado com USP2 e adotar a membrana de diálise como método de estudo. Como meio de liberação foi selecionado o tampão PBS pH 7,4 na temperatura de 37°C e 50 rpm de agitação, para se aproximar de condições fisiológicas que mimetizam a corrente sanguínea. Devido à elevada sensibilidade, o HPLC foi definido como método analítico, com concentração de estudo de acordo com as condições *sink* (abaixo de 30% da saturação do fármaco no meio).

### 6.1.2 . Avaliação de cinética de liberação *in vitro* de RBL encapsulada

No contexto do desenvolvimento de novas tecnologias terapêuticas, compreender o mecanismo envolvido na liberação do fármaco torna-se imprescindível, especialmente para desenvolvimento de tecnologias que pretendem estabelecer sistemas de liberação controlada. No presente trabalho, as nanopartículas poliméricas com RBL encapsulada podem ser consideradas como sistemas monolíticos. Neste tipo de sistema, o agente terapêutico está disperso na matriz polimérica e possui uma liberação controlada por difusão através da matriz da partícula (RAVAL *et al.*, 2010). Além do controle por difusão, neste trabalho foi avaliada a hipótese de modulação da liberação a partir da alteração da mobilidade de cadeia, que seria modificada por meio da Tg do material. A Figura 6.2 ilustra o mecanismo de liberação da hipótese proposta. A Tg é, geralmente, uma propriedade subestimada, mas de fácil medição e modificação, que pode influenciar a velocidade de difusão de fármacos (QIAN; BERKLAND, 2021). Assim, com a redução da Tg, promove-se uma alteração de estado da partícula de vítreo para elastomérico, aumentando a flexibilidade e mobilidade de cadeias poliméricas. Supõe-se, então, que este fato pode favorecer o mecanismo de difusão do fármaco pela partícula.

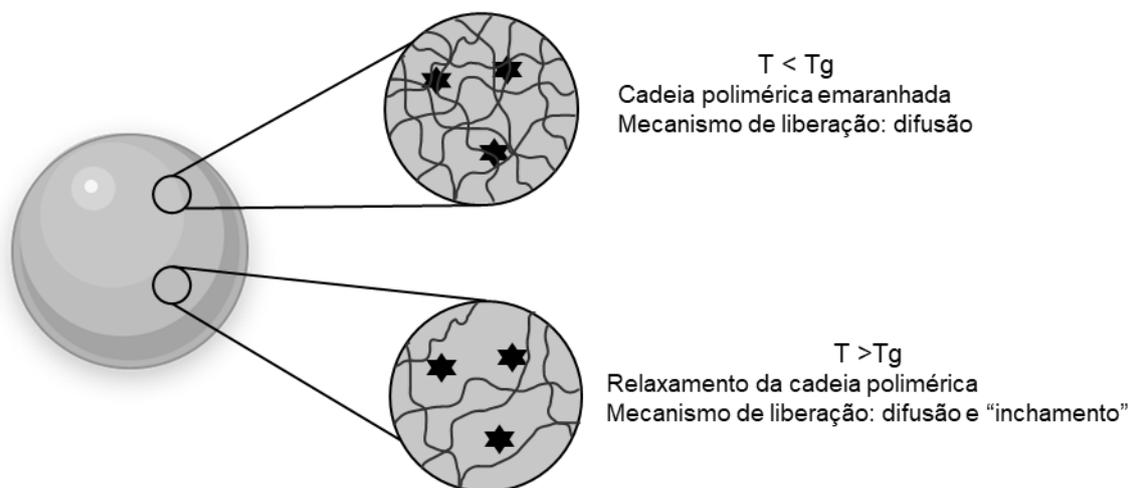


Figura 6.2. Esquema ilustrativo da hipótese sugerida neste trabalho: controle de liberação de fármaco por meio da modulação de Tg do material da nanopartícula.

A avaliação de liberação de RBL encapsulada foi conduzida utilizando partículas no formato látex e liofilizado, visando também a estudar se há interferência entre o estado da partícula e o perfil cinético obtido. A Figura 6.3 apresenta as curvas cinéticas para os ensaios conduzidos com látex polimérico.

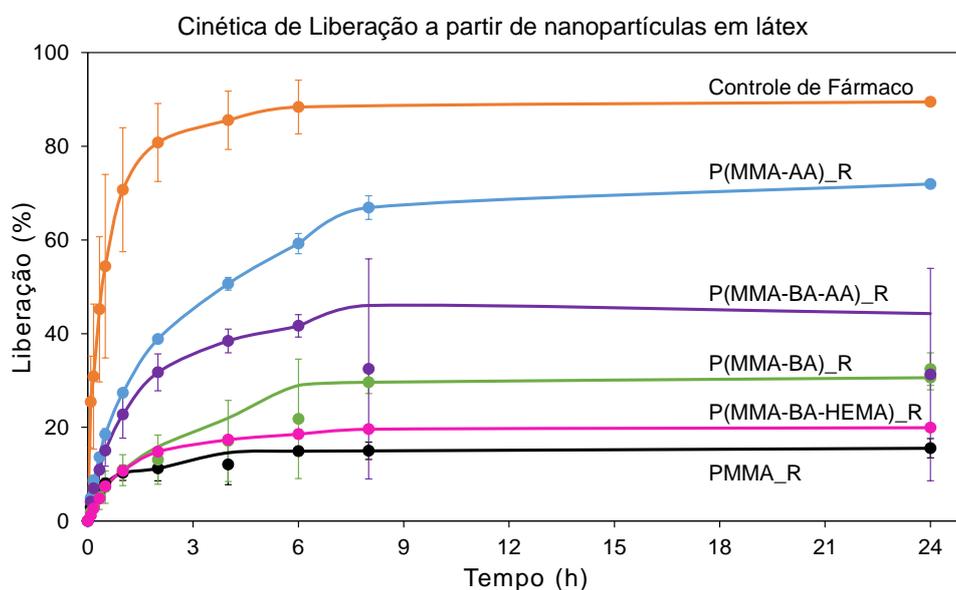


Figura 6.3. Cinética de liberação obtida para os copolímeros nos ensaios de liberação *in vitro* conduzidos com nanopartículas em látex. Os resultados são apresentados na forma de média da triplicata experimental (esferas) com desvio padrão e linha de tendência.

O resultado encontrado para o controle de fármaco possibilitou concluir sobre a adequabilidade da metodologia empregada. O tamanho de poro e o material da membrana de diálise podem apresentar um efeito de barreira, criando uma resistência à difusão pela membrana (YU *et al.*, 2019). Assim, a escolha de uma membrana de diálise adequada é fundamental para evitar interpretações indevidas dos resultados de liberação a partir de nanocarreadores. Verificou-se que a membrana de diálise não apresentou tais resistências, visto que a liberação de RBL pode ser observada desde os primeiros momentos de ensaio, sem atraso, criando uma curva em formato ascendente agudo e liberação quase completa em menos de 3h de ensaio. Outra informação dada pela curva de controle diz respeito à estabilidade do fármaco. Devido à ausência de flutuação de concentração no decorrer do ensaio e ao perfil final constante, pode-se concluir que o fármaco manteve a sua estrutura estável, sem degradação, permitindo a correta identificação e quantificação por HPLC (como indicado nos cromatogramas e na curva de calibração do Apêndice 8).

Adicionalmente, a adsorção de fármaco no filtro de seringa foi limitada, correspondendo a um aumento de até 5% ao final das 24 horas de ensaio, conforme explicitado no Apêndice 9. Assim, afirma-se que a metodologia proposta aqui foi apropriada para a determinação de liberação de RBL no meio e nas condições testadas.

Ao analisar os perfis obtidos pelos polímeros, identificou-se um atraso de liberação em relação ao observado para o controle de fármaco. Este fato, que já era previsto, indica que os nanocarreadores apresentaram uma resistência de difusão mais intensa, que é explicada pela presença da matriz polimérica. Ao final das 24h, ainda foi observado fármaco encapsulado e não liberado, já que o maior valor liberado foi de 75%. Isto indica que ainda há potencial para liberação controlada.

Entre os materiais analisados, o polímero controle PMMA foi o que apresentou menor percentual de liberação após as 24h de ensaio, com uma média de 16% liberado, indicando que as copolimerizações podem ter influenciado a liberação do fármaco. De fato, os copolímeros com Tg modificada P(MMA-BA-AA), P(MMA-BA), e P(MMA-BA-HEMA) apresentaram resultados de liberação superiores, com 46%, 32% e 21%, respectivamente.

A teoria de liberação controlada por Tg já foi de fato testada e validada na literatura. LAPPE *et al.* (2017) identificaram um aumento instantâneo da liberação de fármacos encapsulados em nanopartículas de PLA e PLGA quando em temperaturas acima das Tg's dos materiais (LAPPE *et al.*, 2017). O efeito da Tg pode ser ainda especialmente relevante, mesmo considerando outras propriedades poliméricas, como massa molar e cristalinidade, como indicado em outro estudo de nanopartículas de PLGA (TAKEUCHI *et al.*, 2017). Em acrilatos, os resultados também foram promissores. Nanocápsulas de copolímeros baseados em MMA e estireno apresentaram um perfil de liberação de fragrância mais rápido, quando a temperatura do meio foi significativamente superior à Tg do material (THEISINGER *et al.*, 2009). Adicionalmente, um estudo metucioso envolvendo 59 nanofibras de polímeros hidrofóbicos e não degradáveis, como PMMA e copolímeros, mostrou que a Tg é um fator crítico para liberação de ativos encapsulados (QIAN; BERKLAND, 2021). Assim, essas evidências motivaram fortemente a hipótese de que a Tg poderia influenciar e controlar a liberação do fármaco hidrofóbico RBL encapsulado nas nanopartículas hidrofóbicas e não degradáveis sintetizadas neste trabalho

Contudo, a notável lentidão apresentada pelo copolímero P(MMA-BA-HEMA) pode ser explicada pela possível predisposição à reticulação e à estrutura de hidrogel, que pode retardar a difusão da molécula pela matriz polimérica. Curiosamente, o copolímero sem modificação de Tg, o P(MMA-AA), apresentou o perfil de liberação mais rápido desde o início do ensaio, atingindo 75%. Este fato pode ter relação com a baixa compatibilidade entre AA e a RBL já indicada na literatura (MANGIA *et al.*, 2021), que poderia provocar a maior partição do fármaco em direção ao meio, acelerando a liberação. Entretanto, como este fenômeno foi menos evidente em outro copolímero contendo AA, o P(MMA-BA-AA), sugere-se que existe outro fator atuante. Como a eficiência de encapsulamento é um importante ponto de disparidade entre os polímeros, além da Tg, é importante analisar o efeito das características das partículas nos perfis de liberação. A Figura 6.4 evidencia um comparativo entre o percentual final liberado e as eficiências de encapsulamento dos materiais estudados.

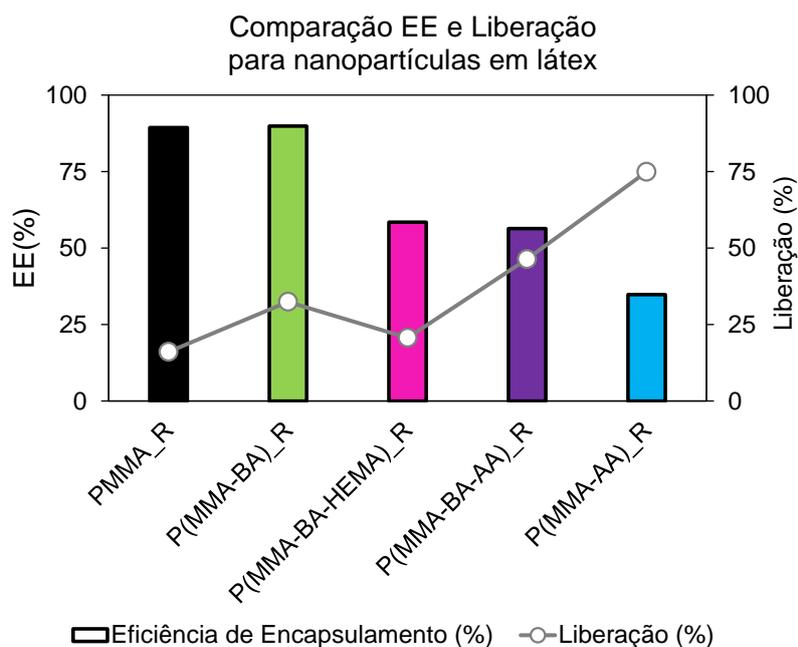


Figura 6.4. Comparação entre eficiência de liberação (%) e liberação (%) após 24h de ensaio de liberação *in vitro* com conduzido com nanopartículas em látex.

A comparação evidenciou uma relação inversa entre o percentual encapsulado e liberado para todos os casos; ou seja, quanto menor o teor de fármaco encapsulado, maior a liberação final obtida. Isso mostra que a eficiência de encapsulamento apresentou uma interferência significativa na liberação de RBL, quando usadas nanopartículas em látex. Assim, visando à avaliação da influência da Tg sobre os perfis de liberação, gráficos

comparativos com os valores de Tg foram construídos com materiais de mesma eficiência de encapsulamento.

A Figura 6.5 apresenta em duas colunas o resultado comparativo entre Tg e percentual de liberação final obtido para materiais com eficiência de encapsulamento de 89% (Figura 6.5-A) e de 57% (Figura 6.5-B) com as suas respectivas curvas cinéticas na fração inferior. Os gráficos sugeriram uma limitada influência da Tg no valor de RBL liberado. Os resultados indicaram a tendência esperada de uma relação inversa entre as variáveis; ou seja, quanto menor a Tg, maior o percentual de RBL liberado. Este fato foi observado tanto para eficiências altas de encapsulamento (de 89%) quanto para as medianas (57%), indicando que o desempenho da Tg foi independente do teor de fármaco encapsulado.

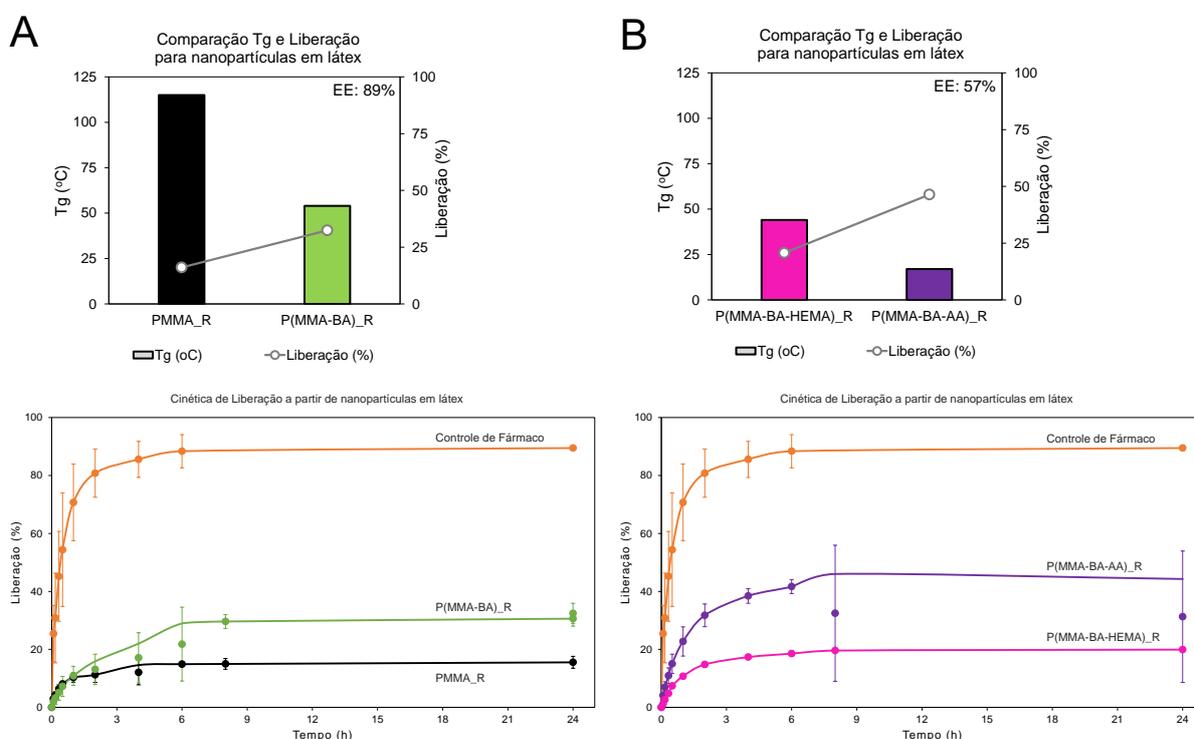


Figura 6.5. Comparação entre Tg (°C) e liberação (%) após 24h, e curva cinética do ensaio de liberação *in vitro* conduzido com nanopartículas em látex. A – Materiais com eficiência de encapsulamento fixa em 89%. B – Materiais com eficiência de encapsulamento fixa em 57%.

As curvas cinéticas dos materiais também permitiram mostrar a tendência da Tg (Figura 6.5). Os materiais com maior Tg, apresentaram curvas mais lentas, indicadas por uma inclinação reduzida, em comparação com materiais de mesma eficiência de encapsulamento e Tg menores. Assim, concluiu-se que, para os ensaios conduzidos com

nanopartícula em látex, a eficiência de encapsulamento apresentou uma influência significativa no perfil de liberação e a Tg apresentou interferência limitada, quando comparados materiais com o mesmo teor de fármaco encapsulado.

Os perfis de cinética de liberação para os ensaios conduzidos com nanopartículas liofilizadas apresentaram um comportamento um pouco diferenciado do observado para as partículas em látex (Figura 6.6). Novamente foi observada uma resistência à liberação de RBL, visualizada pela menor inclinação das curvas, em comparação ao resultado do controle de fármaco, o que foi associado à presença da matriz polimérica. Adicionalmente, não foram atingidos 100% de liberação, mas sim 74%, indicando elevado potencial de liberação, mas ainda com resquício de fármaco incorporado na matriz polimérica. Contudo, a desempenho dos materiais foi diferente em relação ao ensaio realizado com látex.

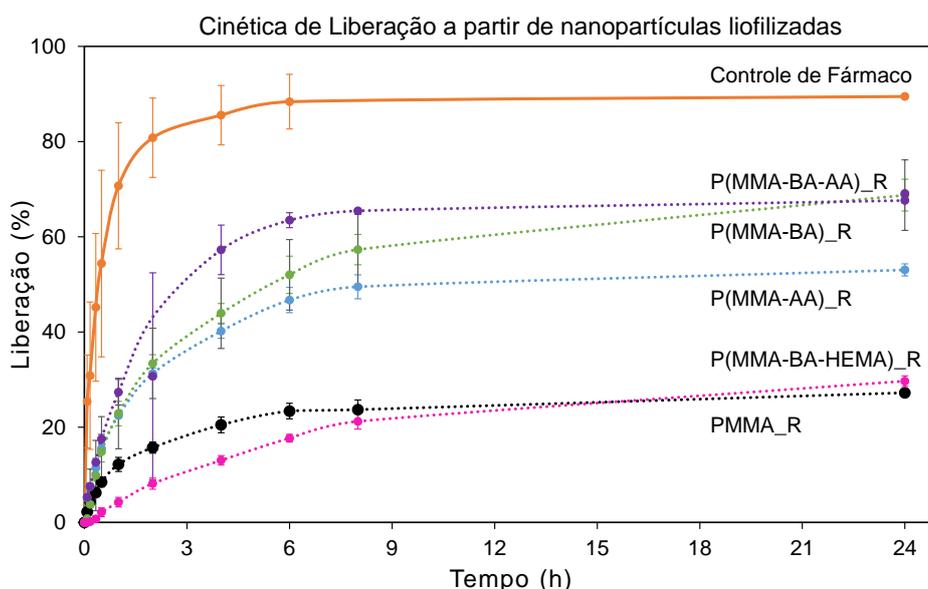


Figura 6.6. Cinética de liberação obtida para os copolímeros nos ensaios de liberação *in vitro* conduzidos com nanopartículas liofilizadas. Os resultados são apresentados na forma de média da triplicata experimental (esferas) com desvio padrão e linha de tendência.

O polímero controle PMMA continuou com o menor resultado de liberação, com uma média de 29% liberado, estatisticamente equivalente ao P(MMA-BA-HEMA). A reduzida liberação deste terpolímero, já apontada no ensaio com nanopartículas em látex, confirma a teoria que a matriz hidrogel pode retardar a liberação. De fato, quando

coeficientes de difusão apresentam comportamento mutável dependente do tempo/posição, como no caso de hidrogéis ou polímeros que sofram inchamento, isso pode influenciar o perfil de liberação, já que o caminho difusivo provocado pelo inchamento pode aumentar, retardando a liberação (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Comparativamente, os polímeros preparados com BA apresentaram nessa nova condição desempenhos superiores em relação aos observados anteriormente.

Novamente, P(MMA-BA), P(MMA-BA-AA) e o P(MMA-AA) exibiram os melhores resultados entre os polímeros testados, porém com uma tendência distinta quando comparamos os ensaios com nanopartículas em látex e liofilizadas. Os polímeros com BA indicaram melhora de liberação, quando usadas nanopartículas liofilizadas, atingindo 74% e 69% respectivamente. Contudo, o oposto foi observado para o copolímero P(MMA-AA), que liberou 75% no ensaio em látex, e agora 58%. Novamente, foi construído um comparativo entre o percentual liberado, eficiência de encapsulamento e Tg dos materiais, a fim de investigar se a tendência observada para o ensaio em látex também seria confirmada para os ensaios conduzidos com nanopartículas liofilizadas (Figura 6.7).

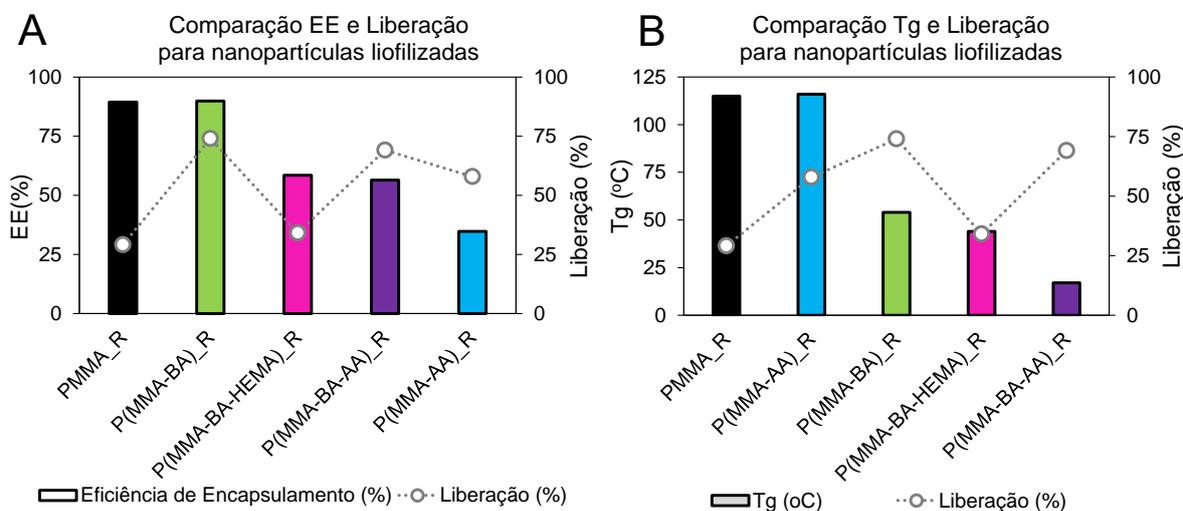


Figura 6.7. Comparação entre propriedades dos materiais e liberação (%) após 24h de ensaio de liberação *in vitro* conduzido com nanopartículas liofilizadas. A- Comparação com a eficiência de encapsulamento dos materiais. B- Comparação com a Tg dos materiais.

Ao contrário da clara tendência observada para os ensaios com látex (Figura 6.4), não houve uma relação expressiva entre o teor de fármaco encapsulado e percentual liberado, quando usadas amostras liofilizadas, conforme indicado na Figura 6.7-A. Já a análise de Tg e liberação (Figura 6.7-B) parece sugerir um certo benefício da queda de Tg para a liberação, especialmente ao considerar PMMA, P(MMA-BA) e P(MMA-BA-AA). Entretanto, não foi possível concluir o fato categoricamente, indicando que existem outros fatores e propriedades da partícula que podem influenciar a liberação de fármaco, visto os resultados de P(MMA-AA) e P(MMA-BA-HEMA) contrários às expectativas geradas inicialmente. Assim, levando-se em consideração as divergências observadas para os ensaios conduzidos com látex e com amostra liofilizada, sugere-se que o processo de liofilização possa ter influenciado a distribuição de moléculas de fármaco nas nanopartículas.

A Figura 6.8 ilustra a suposição acerca do interior da membrana de diálise, quando usadas nanopartículas em látex e liofilizadas. Supõe-se que, quando amostras em látex foram utilizadas, as moléculas de fármaco não encapsuladas durante a polimerização *in situ*, estariam já dispersas no meio e disponíveis para difusão através da membrana de diálise. Assim, essas moléculas foram contabilizadas no percentual de fármaco liberado calculado, superestimando a capacidade de liberação das nanopartículas. Este efeito torna-se especialmente significativo para os casos de baixa eficiência de liberação, que conta com uma grande quantidade de fármaco não encapsulado e já “liberado” no meio. Com a liofilização, esse efeito de fármaco livre foi menos atuante.

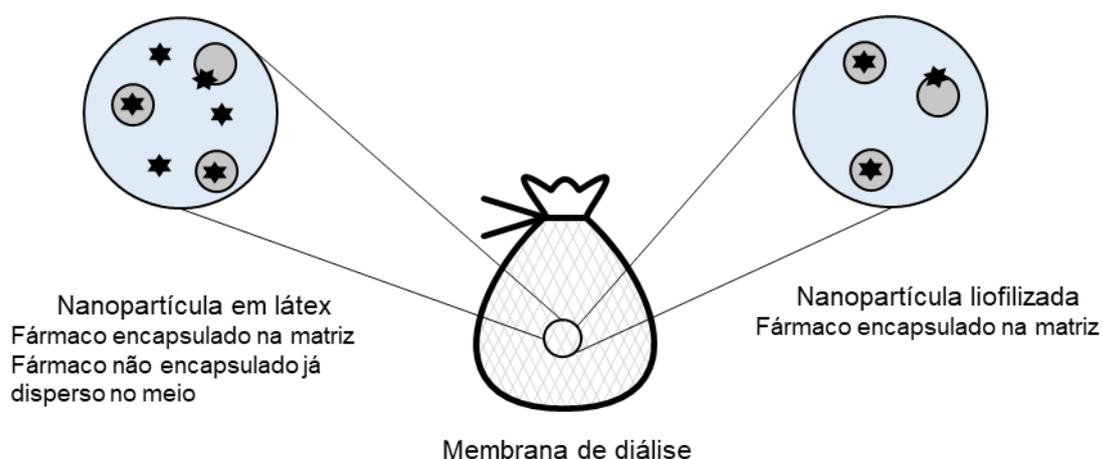


Figura 6.8. Esquema ilustrativo do interior da membrana de diálise nos ensaios de liberação. Comparação entre o comportamento de nanopartículas em forma de látex, que apresenta fármaco já disperso no meio, e de nanopartículas liofilizadas.

A liofilização se baseia no processo de sublimação de solventes a partir da redução de pressão para secagem das nanopartículas (DEGOBERT; AYDIN, 2021). Aqui, estima-se que moléculas de fármaco não encapsuladas possam ter sublimado juntamente com o solvente aquoso, reduzindo a sua concentração na fração livre e já dispersa. Adicionalmente, considera-se que, durante o processo de congelamento, moléculas de fármaco não encapsuladas foram crioconcentradas nos interstícios das partículas, estimulando uma adsorção superficial, novamente reduzindo a concentração livre e disponível. Esses fatores poderiam explicar a redução da influência da eficiência de encapsulamento nos valores de liberação, quando usadas nanopartículas liofilizadas. Contudo, de forma geral, nanopartículas liofilizadas apresentaram desempenhos de liberação levemente superiores às nanopartículas dispersas no látex.

Efetivamente, uma melhoria de desempenho de perfis de dissolução para partículas liofilizadas não é novidade na literatura. Durante a liofilização, várias forças tensionais podem ser aplicadas, que podem influenciar as propriedades das nanopartículas. Não é incomum registros sobre alterações nas paredes das partículas, as quais podem promover vazamento de conteúdo encapsulado (DEGOBERT; AYDIN, 2021). A ausência do uso de crioprotetores pode, também, ter influenciado na estrutura física da nanopartícula. Assim, supõe-se que pequenas modificações superficiais possam ter facilitado a liberação de fármaco encapsulado, explicando os melhores resultados encontrados para partículas liofilizadas em relação às do látex.

A liberação de RBL também foi avaliada a partir da modelagem matemática dos dados de cinética. A modelagem permite uma descrição acurada dos eventos para compreensão dos fenômenos e mecanismos envolvidos, podendo também assumir um caráter preditivo (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Vários modelos matemáticos foram aplicados aos dados obtidos por meio da cinética de liberação e avaliados de acordo com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência de dissolução, cujos valores integrais estão dispostos no Apêndice 10. Consideraram-se os modelos de Weibull e de Korsmeyer-Peppas na discussão, devido às suas pertinências matemática e fenomenológica. A Tabela 6.2 apresenta os resultados encontrados, especialmente as métricas de qualidade de ajuste, a eficiência de dissolução e os coeficientes dos modelos, com as interpretações cabíveis.

O modelo de Weibull apresenta grande versatilidade para adequação aos dados de liberação (JAHROMI *et al.*, 2020; LANGENBUCHER, 1972). A grande flexibilidade é

relacionada ao equacionamento matemático, que permite adequação de vários perfis de liberação como monofásicos, bifásicos e outros complexos (JAHROMI *et al.*, 2020). O coeficiente  $b$ , apesar de não apresentar significado físico, pode indicar o formato da curva de liberação: parabólica ( $b < 1$ ), exponencial ( $b = 1$ ) ou sigmoideal ( $b > 1$ ) (LANGENBUCHER, 1972). Por isso, pode-se adicionar um caráter preditivo à análise Weibull (JAHROMI *et al.*, 2020), que pode ser usada no processo de síntese de nanomateriais para previsão de comportamentos de liberação mais adequados.

A versatilidade da equação de Weibull foi confirmada, já que este modelo matemático foi o que apresentou maior coeficiente de ajuste ( $R^2$ ) aos dados experimentais, tanto para os ensaios conduzidos com látex quanto para os conduzidos com nanopartículas liofilizadas. Adicionalmente, o modelo apresentou grande adequação ao formato da curva de liberação ao indicar o formato parabólico, confirmado visualmente pelas figuras de curva de cinética de liberação, nas Figura 6.3 e Figura 6.6. Assim, notou-se que o modelo de Weibull representou adequadamente a curva cinética de liberação dos ensaios realizados com elevada correlação confirmada matematicamente, com  $R^2 > 0,9$ , e visualmente, a partir das curvas de formato parabólico.

Tabela 6.2. Modelos matemáticos, equações, determinantes de qualidade, coeficientes e interpretação matemática e física dos modelos mais adequados aos dados experimentais.

	Nanopartículas em látex					
	Weibull			Korsmeyer-Peppas		
	$Q = 100 \cdot \left(1 - \exp\left[-\frac{(t)^b}{a}\right]\right)$			$Q = k \cdot t^n$		
	$R^2$	$b$	Comportamento matemático	$R^2$	$n$	Mecanismo
PMMA_R	0,95	0,24	parabólico	0,95	0,22	difusão
P(MMA-AA)_R	0,98	0,53	parabólico	0,97	0,34	difusão
P(MMA-BA)_R	0,98	0,42	parabólico	0,98	0,37	difusão
P(MMA-BA-AA)_R	0,96	0,28	parabólico	0,96	0,23	difusão
P(MMA-BA-HEMA)_R	0,98	0,31	parabólico	0,97	0,28	difusão

### Nanopartículas liofilizadas

	Weibull			Korsmeyer-Peppas		
	R <sup>2</sup>	b	Comportamento matemático	R <sup>2</sup>	n	Mecanismo
	$Q = 100 \cdot \left(1 - \exp\left[-\left(\frac{t}{a}\right)^b\right]\right)$			$Q = k \cdot t^n$		
PMMA_R	0,97	0,34	parabólico	0,97	0,31	difusão
P(MMA-AA)_R	0,98	0,41	parabólico	0,97	0,31	difusão
P(MMA-BA)_R	0,99	0,55	parabólico	0,98	0,38	difusão
P(MMA-BA-AA)_R	0,98	0,53	parabólico	0,97	0,33	difusão
P(MMA-BA-HEMA)_R	0,66	0,88	parabólico	0,66	0,88	inchamento/ dilatação

Já o modelo semiempírico de Korsmeyer-Peppas é um dos modelos mais utilizados, construído a partir de hipóteses simplificadoras de fenômenos reais, podendo indicar o mecanismo de liberação de fármaco em condições específicas (RITGER; PEPPAS, 1987a, b). Ele é considerado um modelo do tipo lei de potência, em que o parâmetro  $n$  é um indicativo do mecanismo de liberação, dependendo da geometria do suporte (filme, cilíndrico ou esférico). Especialmente para o formato esférico, quando  $n=0,43$  é considerada que a liberação é controlada por difusão Fickiana. Já quando  $n=0,85$ , o transporte dominante é o de inchamento/dilatação. Finalmente, quando  $0,43 < n < 0,85$ , há uma combinação dos dois fenômenos, sendo então considerado um transporte anômalo (RITGER; PEPPAS, 1987b; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Assim, o simplificado modelo de Korsmeyer-Peppas permite descrever adequadamente o comportamento de liberação controlada de suportes poliméricos.

A análise dos coeficientes do modelo de Korsmeyer-Peppas permitiu avaliar o tipo de mecanismo envolvido na liberação de RBL. O coeficiente de correlação mostrou grande correspondência dos dados ( $R^2 > 0,9$ ), sugerindo boa proximidade com a descrição de mecanismo proposta pelo modelo. A grande maioria dos ensaios resultou em  $n < 0,43$ , que *a priori* não está considerado na faixa de valores possíveis para suportes esféricos. RITGER E PEPPAS (1987) indicaram que o valor de  $n$  pode variar de acordo com a amplitude e o formato da curva de distribuição de tamanho de partícula; por isso, não seria possível antecipar outros valores limites para  $n$  (RITGER; PEPPAS, 1987a). Assim, levando-se em consideração a proximidade com o valor inferior de  $n=0,43$ , foi considerado que o mecanismo mais atuante na liberação de RBL para as condições estudadas foi o de difusão clássica; isto é, impulsionada por gradiente de concentração. Este resultado confirma a hipótese prevista de que as nanopartículas são sistemas

monolíticos, de matriz polimérica densa e com fármaco disperso em sua extensão. Contudo, a inexistência de mecanismo anômalo indica ausência de contribuição por inchamento/dilatação, os quais compreenderiam um efeito de Tg. Isto indica, portanto, que embora as Figura 6.5 e Figura 6.7 tenham indicado influência da Tg, o fenômeno não foi substancialmente atuante para governar o mecanismo de liberação. Assim, outros fatores, que não foram analisados profundamente neste trabalho, como interação fármaco-polímero, podem exercer efeito predominante na liberação de RBL a partir das nanopartículas sintetizadas neste projeto.

Tendo em vista a limitação de interpretação física do modelo Weibull, simulações matemáticas de modelos difusivos e correlações entre o seu expoente  $b$  e o  $n$  do modelo Korsmeyer Peppas têm sido estudadas para validar o uso de Weibull como modelo matemático descritivo do mecanismo de liberação (KOSMIDIS *et al.*, 2003; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006). De acordo com PAPADOPOULOU *et al.* (2006), o valor de  $b$  pode apresentar uma elevada variação, sugerindo especificidades de mecanismos difusivos e complexos diferentes. Para  $b < 0,75$ , observa-se a dominância de difusão Fickiana, corroborando o resultado da análise do modelo Korsmeyer Peppas feita anteriormente (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006). Entretanto, quanto menor é o valor de  $b$ , maior é o grau de desordem do sistema. Especialmente para os valores encontrados aqui ( $b < 0,69$ ), o mecanismo é caracterizado como difusão Fickiana em espaços fractais; ou seja, com elevada heterogeneidade do meio, como encontrado em matrizes poliméricas (KOSMIDIS *et al.*, 2003). Essa desordem do sistema reforça a importância da segregação de ativos encapsulados na matriz e justifica a lentidão de liberação de ativos (KOSMIDIS *et al.*, 2003), sugerindo que fatores de interação fármaco-polímero podem apresentar elevada relevância para os modelos poliméricos testados.

Em particular, a nanopartícula liofilizada do terpolímero P(MMA-BA-HEMA)\_R apresentou resultados discrepantes dos outros materiais estudados. O modelo matemático com melhor correlação ( $R^2 > 0,9$ ) foi o de Baker-Lonsdale (Apêndice 10) e não o de Weibull. Entretanto, o modelo de Baker-Lonsdale também é representativo de liberação controlada em matrizes esféricas (BRUSCHI, 2015); logo, adequado ao modelo de nanopartícula polimérica proposto aqui. Outro ponto de divergência foi o mecanismo de liberação sugerido pela análise de coeficiente do modelo Korsmeyer-Peppas. Desta vez, o valor de  $n$  sugere um mecanismo de liberação regido principalmente por inchamento/dilatação, ao contrário dos outros materiais testados. Isto indica grande

importância do comportamento hidrogel do copolímero HEMA, que poderia, portanto, dominar o mecanismo de liberação em formulação liofilizada.

De forma geral, foi possível estabelecer que o ensaio com melhor desempenho foi o do material liofilizado P(MMA-BA-AA)\_R, com média de 68% de liberação. Esse resultado é interessante, já que este material apresenta modificação superficial que possibilita adsorção química de biomoléculas com altas eficiências. Assim, tem-se um material com comportamento promissor para liberação de RBL encapsulada e para reconhecimento e direcionamento específico.

O comportamento observado aqui também foi consideravelmente satisfatório, quando comparados com os resultados descritos na literatura envolvendo liberação de RBL. Embora CRAPARO *et al* (2008) tenham obtido elevados percentuais de liberação (75,2% para meio PBS e 67,5% para meio simulando plasma sanguíneo), os autores justificaram os resultados promissores com a escolha do método de associação de fármaco. Ao utilizar o método de imersão, as moléculas de fármaco se posicionaram preferencialmente na superfície da partícula, facilitando a dissolução nos meios (CRAPARO *et al.*, 2008). Neste trabalho, o encapsulamento *in situ* de RBL possibilitaria maior proteção do ativo, aumentando a vida útil e controlando a liberação. Adicionalmente, os autores também confirmaram que a natureza do fármaco impacta a velocidade de dissolução. As formulações contendo o tartarato de rivastigmina apresentaram liberação mais rápida do que as contendo RBL, devido à maior solubilidade da molécula no meio de liberação (CRAPARO *et al.*, 2008). Este fato também reforça a grande dificuldade de disponibilizar integralmente uma molécula hidrofóbica encapsulada, como o caso estudado aqui.

Outro trabalho envolvendo associação superficial de RBL foi estudado por HEMMATI *et al.* (2016). Os autores realizaram a adsorção física de RBL em nanoestruturas poliméricas modificadas com grafeno e observaram que o pH do meio influenciou a taxa de liberação. A maior velocidade de liberação, culminando em 86%, foi associada ao baixo pH, que modificou a estrutura no nanossistema, possibilitando a liberação continuada por dias (HEMMATI *et al.*, 2016). Novamente, a maior disponibilidade superficial do fármaco pode facilitar a dissolução no meio, fato que não é possível utilizando o método de encapsulamento *in situ* estudado aqui. No fim, os autores também relataram a importante relação de interações entre as moléculas de fármaco e a estrutura de grupos funcionais do nanossistema na redução de liberação de

fármaco (HEMMATI *et al.*, 2016). Esta hipótese também foi considerada neste trabalho, devido à lentidão de liberação observada e as características dos suportes poliméricos, como o grau de desordem e possível comportamento hidrogel.

Tanto o trabalho de CRAPARO *et al.* (2008) quanto o de HEMMATI *et al.* (2016) não realizaram correlações com modelos matemáticos e não investigaram o mecanismo de liberação do fármaco. Esta escolha não foi justificada pelos autores, mas pode ter relação com o mecanismo de adsorção de fármaco. Novamente, essa carência de investigação de fenômenos e mecanismos envolvidos ilustra a grande lacuna que se tem na área de liberação controlada em nanossistemas. O trabalho de MOHAMADPOUR *et al.* (2022) foi, portanto, o único, entre os analisados, a realizar o ensaio de liberação *in vitro* de RBL e investigar o mecanismo atuante.

Os autores realizaram o encapsulamento de RBL em nanopartículas biodegradáveis sintetizadas a partir de poli(etilenoglicol) e poli(caprolactama) (MOHAMADPOUR *et al.*, 2020). O perfil de liberação obtido apresentou um caráter bifásico, associado à dissolução preliminar de fármaco não encapsulado, o que pode ter relação com a eficiência de encapsulamento de 40%. Em 8h, a liberação de RBL foi completa e o modelo matemático de maior correlação experimental foi o de Weibull (com  $R^2=0,996$ ), como também encontrado aqui. Os autores concluíram, a partir do expoente  $b$ , que o mecanismo de transporte atuante seria uma combinação entre difusão e caso-II (MOHAMADPOUR *et al.*, 2020). Este comportamento pode estar associado à biodegradabilidade das nanopartículas, característica ausente nos materiais sintetizados aqui.

De forma geral, o ensaio de liberação de RBL *in vitro* permitiu concluir que os copolímeros aperfeiçoaram o desempenho de liberação do polímero modelo (PMMA), em especial quando usadas formulações liofilizadas. Os modelos matemáticos de maior correlação foram Weibull e Korsmeyer Peppas, e sugeriram a difusão como principal mecanismo de liberação, o que está de acordo com a hipótese proposta para os nanocarreadores poliméricos sintetizados. A  $T_g$  apresentou impacto limitado na liberação, sugerindo que interações entre fármaco-polímero sejam mais atuantes no sistema estudado neste trabalho. O terpolímero liofilizado P(MMA-BA-AA)\_R apresenta notório destaque, pois permite somar o controle promissor de liberação com modificação superficial para adsorção química de biomoléculas *situ*-específicas.

## 6.2 Segurança das nanopartículas poliméricas

Os ensaios de exposição de células oriundas de linhagem humana às nanopartículas permitem conhecer e antecipar os possíveis efeitos dos nanocarreadores em ambiente *in vivo*. Neste trabalho, as nanopartículas brancas foram selecionadas para os ensaios com células, visando a avaliar a existência de efeitos tóxicos relacionados à composição do nanomaterial. A escolha das nanopartículas foi determinada a partir do desempenho na liberação de fármaco *in vitro*; portanto, P(MMA-BA-AA) e os seus respectivos controles, PMMA e P(MMA-BA).

A Figura 6.9 apresenta a viabilidade celular calculada para cada concentração e nanomaterial avaliados. O homopolímero PMMA não apresentou impacto relevante na viabilidade celular, indicando completa biocompatibilidade (acima de 95%) independentemente da concentração testada. Contudo, os copolímeros apresentaram comportamentos diferenciados.

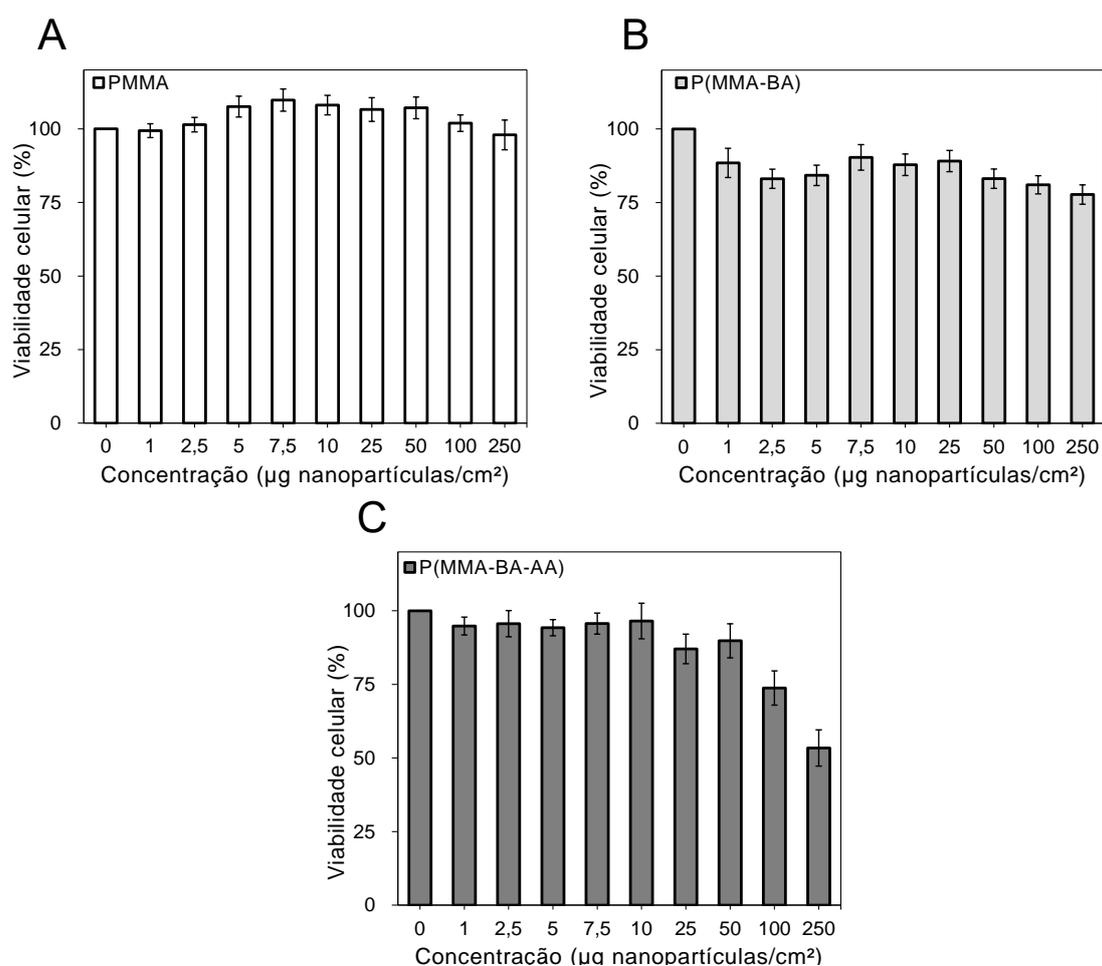


Figura 6.9. Viabilidade celular de HPAEC após 24h de exposição em concentração crescente de A- PMMA, B- P(MMA-BA) e C- P(MMA-BA-AA). Dados apresentados na forma de média de replicatas experimentais com barras de desvio padrão.

O copolímero P(MMA-BA) apresentou elevada viabilidade celular (acima de 75%) nas condições testadas, mas a ligeira tendência de queda de viabilidade em altas concentrações sugere um comportamento de toxicidade dose-dependente. Já o terpolímero P(MMA-BA-AA) apresentou uma toxicidade celular dose-dependente, demonstrada pela queda significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  com, aproximadamente, 50% de morte celular a 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

A Figura 6.10 exibe um comparativo dos comportamentos observados para os três materiais testados. O gráfico deixa claro o comportamento inerte do homopolímero PMMA e a queda expressiva de viabilidade celular, próxima da toxicidade de 50% para o terpolímero P(MMA-BA-AA).

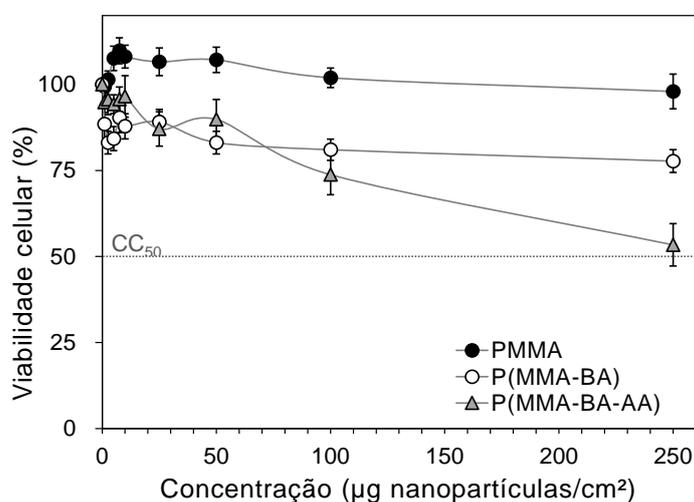


Figura 6.10. Comparativo da viabilidade celular de HPAEC calculada para os nanomateriais poliméricos avaliados partindo de uma solução 250 $\mu\text{g}$  de nanopartícula/L.

A elevada biocompatibilidade de nanopartículas de PMMA já era esperada. Nanopartículas de PMMA apresentaram boa biocompatibilidade em células de câncer de mama de camundongo (4T1) quando em concentrações de até  $1,15 \times 10^{12}$  nanopartículas/mL e viabilidade celular acima de 80% em fibroblastos L929 para ensaios conduzidos até 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (COLOMBO *et al.*, 2013; GRAÇA *et al.*, 2017). Como ambos os estudos mencionados apresentaram concentrações superiores às avaliadas neste trabalho, os resultados obtidos confirmam a segurança do uso de partículas de PMMA.

Por outro lado, a informação acerca da toxicidade de nanopartículas baseadas em acrilato de butila é limitada. Contudo, HIEBL *et al* (2012) obtiveram viabilidade celular próxima de 100% quando avaliaram a toxicidade celular de suportes baseados em PBA com células endoteliais primárias (HIEBL *et al.*, 2012). Essa informação vai ao encontro

da alta viabilidade também encontrada para as nanopartículas de PBA estudadas neste trabalho. Por isso, sugere-se que o termopolímero indica leve toxicidade associada à presença do AA.

De fato, MANGIA *et al* (2021) encontraram que o valor de CC50 de PMMA em Caco-2 foi de 1569,80 µg nanopartículas/mL (1,5 g/L) e 834,19 µg/mL(0,8 g/L) para P(MMA-AA) (MANGIA *et al.*, 2021), o que corrobora os resultados encontrados nesta pesquisa. ERSOZ E ALLANVERDIYEV (2021) também encontraram um efeito de toxicidade dose dependente, com redução expressiva de viabilidade celular partir de 10 mg/mL para PAA em ensaio *in vitro* com modelo celular de câncer de mama humano e fibroblasto animal (MCF-7 e L-929, respectivamente) (ERSOZ; ALLAHVERDIYEV, 2021). Assim, indica-se que a ligeira redução de viabilidade observada possa ser relativa ao AA e à sensibilidade do modelo celular usado.

Nanopartículas de carbono testadas no mesmo modelo celular de HPAEC apresentaram viabilidade celular próxima de 60% para 10 µg/cm<sup>2</sup> com indícios de alterações de metabolismo celular (DEWEIRDT *et al.*, 2020). Neste trabalho, a concentração encontrada para o mesmo efeito na viabilidade celular foi de 250 µg/cm<sup>2</sup>, cerca de 4 vezes superior, indicando que os polímeros testados apresentam boa biocompatibilidade com células humanas sem a indução de metabolismo celular tóxico.

Os resultados são ainda mais valorosos quando comparados à dose máxima do fármaco administrada em tratamento. Em um estudo farmacocinético do fabricante conduzido com o medicamento em adesivo, de princípio ativo RBL, cerca de 13 ng rivastigmina/mL foi detectada como a concentração plasmática máxima após um período de teste de 24h (EXELON, 2018). No presente trabalho, não foi feita a análise com formulações carreadoras de fármaco. Entretanto, utilizando o desempenho de biocompatibilidade equivalente ao da formulação P(MMA-BA-AA), a escala de concentração de fármaco avaliada neste estudo *in vitro* seria o correspondente a 0 a 0,17ng fármaco encapsulado/mL. Este valor máximo corresponde a 10 vezes menos a concentração máxima observada no estudo farmacocinético, logo, dentro do intervalo de concentração encontrado em tratamento comercial. Esses resultados são promissores e indicam serem modelos experimentais *in vitro* adequados para estudos de tolerância de formulações carreando fármaco para confirmação dessa hipótese.

## Capítulo 7. Considerações Finais

### 7.1 Conclusões

Esta tese visou ao desenvolvimento de um nanossistema biocompatível com habilidade de funcionalização superficial e de transporte de rivastigmina para uso como carreador de liberação controlada e sítio-dirigida. A escolha do protocolo de miniemulsão e dos materiais escolhidos foram justificadas pela fácil adaptabilidade para síntese de nanopartículas de materiais de copolímeros biocompatíveis com encapsulamento de fármaco *in situ*. Já que os surfactantes podem ter papel significativo na biocompatibilidade do nanossistema, a avaliação de tensoativos convenientes também foi explorada.

Apesar dos surfactantes não iônicos e considerados biocompatíveis, Tween80 e Span80, resultarem em emulsões mais estáveis de MMA em água, os ensaios de homopolimerização em miniemulsão indicaram a necessidade da introdução de SDS para a produção de látexes poliméricos estáveis. Mesmo assim, o protocolo final, contendo Tween80, Span80 e SDS, permitiu uma redução significativa da concentração de surfactantes tóxicos, possibilitando a síntese de nanopartículas poliméricas esféricas monodispersas e estáveis com diâmetros inferiores a 100 nm, conforme sugerido pela literatura para aplicações biomédicas.

O encapsulamento *in situ* do fármaco viabilizou a síntese de nanopartículas poliméricas carreadoras e estáveis sem demandar adaptação da metodologia. Apesar do Tween80 impactar na eficiência de encapsulamento, conseguiu-se elevar a capacidade de carregamento das nanopartículas para 89%, a partir da redução da concentração de Tween80 e de fármaco (agora em 0,5% m/m). O fármaco não causou qualquer alteração estrutural significativa na nanopartícula, sendo essa uma importante vantagem para o controle de qualidade e a previsibilidade de desempenho do nanocarreador.

O emprego de copolimerização foi justificado para adicionar funcionalidades de interesse ao homopolímero PMMA. O uso de copolímeros visou a adição de uma propriedade específica, enquanto os terpolímeros poderiam, portanto, adicionar mais de uma funcionalidade ao material, permitindo a funcionalização química de partículas e o controle de liberação por modulação de mobilidade térmica de cadeia. As copolimerizações foram bem-sucedidas e comparáveis às frações alimentadas, garantindo

manutenção de previsibilidade de composição do material sintetizado. A manutenção da cinética de polimerização, tamanho de diâmetro (inferiores a 100 nm) e homogeneidade e estabilidade dos látex obtidos foram grandes vantagens para manutenção da polimerização em miniemulsão como metodologia de síntese.

Matrizes de copolímeros e terpolímeros carreadoras de fármaco foram obtidas com sucesso por meio da técnica de encapsulamento *in situ*. Copolímeros com comonômeros ácidos apresentaram valores de eficiência medianos e baixos (57% para os terpolímeros e 35% para copolímero com AA), que foram associados ao baixo valor de pKa do fármaco. Ainda assim, outras características de interesse foram preservadas, como o diâmetro de partícula inferior a 100 nm, percentual de incorporação de comonômeros próximo ao alimentado e redução de temperatura de transição vítrea da nanopartícula, confirmados pelas técnicas de DLS e MEV, RMN e DSC, respectivamente.

Os resultados de funcionalização comprovaram que os copolímeros são muito promissores para imobilização de biomoléculas, que podem ser usadas como direcionadores de entrega de fármacos. Aminoácidos e, especialmente, proteínas de maiores pesos moleculares foram adsorvidos com sucesso em copolímeros, com eficiências superiores a 80%, neste último caso. Esse alto valor de eficiência confirma a grande potencialidade dessas nanopartículas para modificação superficial com adsorção de moléculas, possibilitando ampliar o espectro de biomoléculas que podem ser usadas para fins de vetorização. Em especial, polímeros contendo AA apresentaram desempenho superior e melhor estabilidade do látex. Portanto, o uso de copolímeros permitiu a síntese de nanopartículas carreadoras de fármaco com alto potencial de funcionalização superficial com aminoácidos, proteínas e hormônios.

A investigação do potencial das nanopartículas como nanocarreadores de fármaco para liberação controlada de fármaco foi realizada após o desenvolvimento de um protocolo experimental *in vitro*. Os resultados confirmaram o controle de liberação com sucesso associada à matriz polimérica até 8h, com desempenho superior dos copolímeros em relação ao PMMA. Ensaios conduzidos com amostra em látex apresentaram resultados inferiores em relação às formulações liofilizadas e com grande influência da eficiência de liberação. Apesar da investigação da modulação da temperatura de transição vítrea como mecanismo de aumento de mobilidade de cadeia, as análises matemáticas com o modelo semiempírico Korsmeyer-Peppas indicaram que a liberação foi regida pelo mecanismo difusivo clássico para a maioria dos casos testados. A exceção foi para

P(MMA-BA-HEMA), cuja cinética lenta foi associada ao mecanismo de inchamento do hidrogel. Os melhores resultados foram observados para P(MMA-BA-AA) e P(MMA-BA), sugerindo que interações fármaco-polímero podem influenciar no controle de liberação.

A avaliação da segurança dos nanomateriais utilizando ensaios *in vitro* com cultura celular de origem humana possibilitam investigar o efeito da introdução dos nanocarreadores em ambiente biológico. Os resultados mostraram viabilidades celulares superiores à 90%, indicando elevada biocompatibilidade das nanopartículas sintetizadas. Assim, confirmou-se que os materiais sintetizados foram biocompatíveis nas concentrações avaliadas, usando células humanas.

Portanto, os resultados desta tese permitiram concluir que foi possível desenvolver nanopartículas de copolímeros capazes de carrear o fármaco rivastigmina base livre com elevada biocompatibilidade, controle de distribuição de tamanho, composição previsível e potencial de vetorização. A Figura 7.1 apresenta um infográfico dos principais resultados dos nanocarreadores destacando o desempenho superior do terpolímero P(MMA-BA-AA) em relação a combinação de propriedades de interesse em liberação, imobilização de biomoléculas e carregamento de fármaco, constituindo um modelo promissor de nanocarreador biocompatível com potencial para direcionamento de fármaco. Assim, estes resultados mostraram-se favoráveis para o desenvolvimento de nanocarreadores poliméricos funcionalizados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial a doença de Alzheimer.

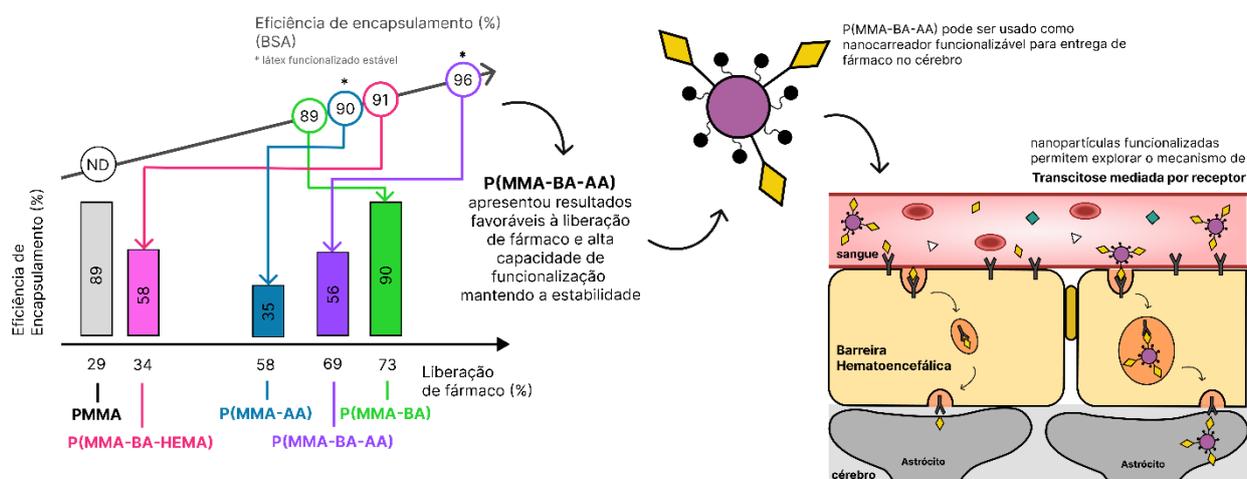


Figura 7.1. Infográfico das propriedades das nanopartículas sintetizadas, destacando a superioridade da formulação P(MMA-BA-AA). À direita, o esquema ilustra a sua aplicação como nanocarreador funcionalizado utilizando o mecanismo transcitose mediada por receptor para passagem da nanopartícula pela barreira hematoencefálica visando a entrega no cérebro.

## 7.2 Sugestões de ensaios futuros

Os resultados apresentados aqui mostraram grande potencialidade para os objetivos almejados nesta tese. Contudo, o desenvolvimento de um nanocarreador polimérico com função terapêutica sítio-específica se configura como tema bastante complexo, envolvendo competências de áreas de conhecimento distintas. Por isso, sugerem-se os seguintes ensaios para complementar os conhecimentos adquiridos nesta tese:

- O uso de muitos insumos para síntese de nanopartículas pode ser indesejável no campo farmacêutico, devido ao elevado nível de controle e qualidade exigido. Por isso, sugere-se a investigação de outros surfactantes biocompatíveis não iônicos na estabilidade das miniemulsões, visando à redução do número de componentes na receita experimental.
- Apesar de não serem compulsórios para aplicações farmacêuticas, polímeros biodegradáveis podem apresentar um mecanismo de liberação sustentado de interesse para tratamentos contínuos. Por isso, seria interessante estudar a produção e o encapsulamento do fármaco em nanopartículas polímero biodegradáveis como o PLGA e/ou PBCA, a fim de avaliar se há diferenças de desempenho na liberação de fármaco em relação aos materiais não biodegradáveis;
- Tendo em vista a compatibilidade limitada entre o comonômero ácido acrílico e o fármaco, e os seus resultados interessantes para imobilização de biomoléculas, sugere-se avaliar novos meios de adicionar essa funcionalidade à nanopartícula. Uma alternativa seria testar outros comonômeros menos ácidos com grupos funcionais semelhantes ao ácido acrílico. Outra proposta seria investigar outro mecanismo de funcionalização química que não necessite de terminais ácidos; assim, seria possível contornar a limitação encontrada com este fármaco, permitindo aumentar a eficiência de encapsulamento e manter a capacidade de funcionalização química de biomoléculas;
- Os ensaios *in vitro* são importantes ferramentas para conhecer os impactos dos nanomateriais em sistemas biológicos em condições controladas. Por isso, sugere-se a continuação das investigações *in vitro* usando faixas de

concentração maiores, possibilitando detectar concentrações tóxicas e os possíveis efeitos tóxicos que podem ser desencadeados pelas nanopartículas. Assim, consegue-se gerar conhecimento futuro para limites seguros de testagem *in vivo* e para o desenvolvimento de materiais e nanocarreadores mais biocompatíveis.

- A complexidade biológica não é facilmente replicada em cultura celular *in vitro*. Assim, ensaios com culturas 3D poderiam ser utilizados com o objetivo de avaliar o desempenho das nanopartículas em ambiente biológico mais complexo. Ensaios que visem à avaliação de permeabilidade e fagocitose das nanopartículas poderiam gerar contribuição de conhecimento significativo acerca da interação nano-bio.
- Embora a eficiência sítio-específica das nanopartículas possa ser observada *in vitro* com ensaios de permeabilidade, testes *in vivo* seriam interessantes para avaliar a vetorização eficiente do nanocarreador em ambiente de circulação sanguínea, e a dimensionar a toxicidade real do nanomaterial.
- Foi escolhida a rivastigmina base livre como um modelo de fármaco de atuação no tratamento da doença de Alzheimer. O uso de outros fármacos com sítio alvo no cérebro seria relevante para explorar a generalização do modelo de nanopartícula polimérica funcionalizável como um carreador eficiente de entrega específica ao cérebro.

## Capítulo 8. Referências Bibliográficas

ABOUELMAGD, S. A. *et al.* Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 3, p. 997–1003, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Farmacopeia Brasileira*. 6a. ed. Brasília, 2019. v. II.

AKULA, P.; LAKSHMI, P. K. Effect of pH on weakly acidic and basic model drugs and determination of their ex vivo transdermal permeation routes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, n. 2, p. 1–8, 2018.

ALI, U.; KARIM, K. J. B. A.; BUANG, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews*, v. 55, n. 4, p. 678–705, 2015.

ALVES, J. B. *et al.* Effects of Different Stabilizers on Miniemulsion Methyl Methacrylate Polymerizations. *Macromolecular Symposia*, v. 394, n. 1, p. 1–10, 2020.

ALVES, J. B. *et al.* In situ encapsulation of praziquantel through methyl methacrylate/diethylaminoethyl methacrylate and MMA / DMAEMA miniemulsion copolymerizations in presence of distinct ionic surfactants. *SPE Polymers*, v. 2, n. 2, p. 110–121, 2021.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 15, n. 3, p. 321–387, 2019. Disponível em: <<https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures-2019-r.pdf>>.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. *Alzheimer's Disease International*, v. September, 2018.

ALZHEIMERS ASSOCIATION; ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2017 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement*, v. 13, p. 325–373, 2017.

ANAND, R.; GILL, K. D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, v. 76, n. PART A, p. 27–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>>.

ANNICCHIARICO, R. *et al.* Rivastigmine in Alzheimer's disease : Cognitive function and quality of life. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 3, n. 6, p. 1113–1123, 2007.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science*, v. 27, n. 4, p. 689–757, 2002.

ARYA, M. A. *et al.* Nanotechnology approaches for enhanced CNS delivery in treating Alzheimer's disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 51, n. January, p. 297–309, 2019.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymer Science*, v. 27, p. 1283–1346, 2002.

AWSIUK, K. *et al.* Temperature-Controlled Orientation of Proteins on Temperature-Responsive Grafted Polymer Brushes: Poly(butyl methacrylate) vs Poly(butyl acrylate): Morphology, Wetting, and Protein Adsorption. *Biomacromolecules*, v. 20, n. 6, p. 2185–2197, 2019.

BACHURIN, S. O.; BOVINA, E. V.; USTYUGOV, A. A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Medicinal Research Reviews*, v. 37, n. 5, p. 1186–1225, 2017.

BAHADAR, H. *et al.* Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*, v. 20, n. January, p. 1–11, 2016.

BARNABAS, W. Drug targeting strategies into the brain for treating neurological diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 311, p. 133–146, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027018303236>>.

BARTH, J. *et al.* Termination and Transfer Kinetics of Butyl Acrylate Radical Polymerization Studied via SP-PLP-EPR. *Macromolecules*, v. 43, n. 9, p. 4023–4031, 2010.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337–351, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>.

BILAL, M. *et al.* Nanomaterials for the treatment and diagnosis of Alzheimer's disease: An overview. *NanoImpact*, v. 20, n. August, p. 100251, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100251>>.

BONARDELLI, P.; MOGGI, G.; TURTURRO, A. Glass transition temperatures of copolymer and terpolymer fluoroelastomers. *Polymer*, v. 27, n. 6, p. 905–909, 1986.

BRU, P. *et al.* Particle Size and Rapid Stability Analyses of Concentrated Dispersions: Use of Multiple Light Scattering Technique. *Particle Sizing and Characterization*. American Chemical Society, 2004. p. 45–60. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2004-0881.ch003>>.

BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Woodhead Publishing, 2015. p. 63–86.

CAMPOS, I. *et al.* Effects of miniemulsion operation conditions on the immobilization of BSA onto PMMA nanoparticles. *Polímeros*, v. 29, n. 3, p. 1–10, 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282019000300415&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282019000300415&tlng=en)>.

CAMPOS, I.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Production and Functionalization of P(MMA-co-AA) Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization. *Macromolecular Symposia*, v. 368, n. 1, p. 70–77, 2016.

CANEVAROLO JR., S. V. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. 2a. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F. *et al.* Síntese de Copolímeros Metacrílicos Através da Modificação Química do Poli ( Metacrilato de Metila ) de Massa Molar Controlada. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, p. 156–162, 1999.

CHATURVEDI, V.; KUMAR, A. Toxicity of Sodium Dodecyl Sulfate in Fishes and Animals. A review. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, p. 630–633, 2010. Disponível em: <[http://ijabpt.com/pdf/4054-Chaturvedi\[1\].pdf](http://ijabpt.com/pdf/4054-Chaturvedi[1].pdf)>.

CHAUDHARI, S. P.; DUGAR, R. P. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 41, p. 68–77, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.010>>.

CHEN, X. *et al.* Organ-on-a-chip platforms for accelerating the evaluation of

nanomedicine. *Bioactive Materials*, v. 6, n. 4, p. 1012–1027, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.09.022>>.

CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, n. 7, p. 640–665, maio 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11002900>>.

CHEREMISINOFF, N. P. *Polymer Characterization - Laboratory Techniques and Analysis*. New Jersey: Elsevier, 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815514039500030>>.

CHO, E. J. *et al.* Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 6, p. 2093–2110, 3 jun. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp300697h>>.

CHOLKAR, K.; HIRANI, N. D.; NATARAJAN, C. Nanotechnology-Based Medical and Biomedical Imaging for Diagnostics. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*, p. 355–374, 2017.

COLOMBO, C. *et al.* Cytotoxicity of PMMA-Based Nanoparticles Synthesized Adopting SDS and Tween 80. *Macromolecular Symposia*, v. 324, n. 1, p. 134–139, fev. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/masy.201200078>>.

COX, A. *et al.* Protein-functionalized nanoparticles derived from end-functional polymers and polymer prodrugs for crossing the blood-brain barrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 142, n. June, p. 70–82, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.004>>.

CRAPARO, E. F. *et al.* A Nanoparticulate Drug-Delivery System for Rivastigmine: Physico-Chemical and in vitro Biological Characterization. *Macromolecular Bioscience*, v. 8, n. 3, p. 247–259, 10 mar. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200700165>>.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C*, v. 80, p. 771–784, 2017.

D’SOUZA, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, p. 1–12, 2014.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/57>>.

DE LA FUENTE, J. L.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; LÓPEZ MADRUGA, E. Characterization and thermal properties of poly(n-butyl acrylate-g-styrene) graft copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 80, n. 5, p. 783–789, 2 maio 2001. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628\(20010502\)80:5%3C783::AID-APP1155%3E3.0.CO;2-5](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628(20010502)80:5%3C783::AID-APP1155%3E3.0.CO;2-5)>.

DEGOBERT, G.; AYDIN, D. Lyophilization of nanocapsules: Instability sources, formulation and process parameters. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 8, 2021.

DEWEIRDT, J. *et al.* In vitro study of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: effects on calcium signaling and mitochondrial alterations. *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 7, p. 2331–2348, 1 jul. 2020.

DONG, X. Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics*, v. 8, n. 6, p. 1481–1493, 2018.

EFTEKHARZADEH, B.; HYMAN, B. T.; WEGMANN, S. Structural studies on the mechanism of protein aggregation in age related neurodegenerative diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 156, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2016.03.001>>.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 528, n. 1–2, p. 675–691, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>>.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2545, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15327k>>.

EROLA, M. O. A.; SUVANTO, S.; PAKKANEN, T. T. Influence of compositions and polymerization processes on morphologies, molar mass distributions, and phase structures of n -Butyl acrylate-methyl methacrylate copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 7, 15 fev. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/app.41467>>.

ERSOZ, M.; ALLAHVERDIYEV, A. Investigation of Polyacrylic Acid Toxicity in Human Breast Cancer (MCF-7) and Mouse Fibroblast (L-929) Cell Lines. *Eurobiotech Journal*, v. 5, n. 3, p. 123–129, 2021.

EXELON. *Exelon® Patch Label (rivastigmine transdermal system)*. 2018. Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/022083s026lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/022083s026lbl.pdf)>.

FAN, L.; SINGH, S. K. Controlled Release. *Controlled Release: A Quantitative Treatment*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989. p. 1–7. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-74507-2>>.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 4981, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/permissions.php>>.

FONSECA, L. B. *et al.* Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through “In Situ” Miniemulsion Polymerization. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 7, n. 1, p. 54–63, jan. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mren.201200036>>.

FORMULATION. *Turbiscan Stability Index*. Disponível em: <<https://www.formulation.com/en/knowledge-center/turbiscan-stability-index>>.

FORNAGUERA, C. *et al.* PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood–brain barrier. *Journal of Controlled Release*, v. 211, p. 134–143, ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.002>>.

FRIEDMAN, A.; CLAYPOOL, S.; LIU, R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, n. 35, p. 6315–6329, 2013.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, v. 37, n. 1, p. 48–57, jan. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.028>>.

GAO, X. *et al.* Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration.

*Journal of Controlled Release*, v. 121, n. 3, p. 156–167, 2007.

GAUTAM, S. *et al.* Recent advancements in nanomaterials for biomedical implants. *Biomedical Engineering Advances*, v. 3, n. February, p. 100029, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100029>>.

GEHR, P. Interaction of nanoparticles with biological systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 172, n. July, p. 395–399, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.023>>.

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, p. 152–186, jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.010>>.

GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 7, p. 698–725, jul. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000512>>.

GRAÇA, D. *et al.* Toxicity screening of a novel poly(methylmethacrylate)-Eudragit nanocarrier on L929 fibroblasts. *Toxicology Letters*, v. 276, n. 5, p. 129–137, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.017>>.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, v. 1, n. 5, p. 8–23, 1949.

GUARNIERI, D. *et al.* Shuttle-Mediated Nanoparticle Delivery to the Blood-Brain Barrier. *Small*, v. 9, n. 6, p. 853–862, 25 mar. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/sml.201201870>>.

GUINAMA, S. L. U. *Ficha de dados de seguridad: PECTINA*. Disponível em: <[http://www.oxaquim.com/sites/default/files/producto/37/documents/acido\\_oxalico\\_sds.pdf](http://www.oxaquim.com/sites/default/files/producto/37/documents/acido_oxalico_sds.pdf)><[https://www.guinama.com/documentacion-tecnica/93732\\_FDS-Pectina-v01-Laboratorios-GUINAMA.pdf](https://www.guinama.com/documentacion-tecnica/93732_FDS-Pectina-v01-Laboratorios-GUINAMA.pdf)>.

HACKLEY, V. A. *Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering*. NIST Special Publication 1200-6. Gaithersburg, MD, maio 2015. Disponível em:

<<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST.SP.1200-6.pdf>>.

HEBERT, L. E. *et al.* Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, v. 80, p. 1778–1783, 2013.

HECHT, L. L. *et al.* Determination of the ideal surfactant concentration in miniemulsion polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 214, n. 7, p. 812–823, 12 abr. 2013.

HECHT, L. L. *et al.* Surfactant concentration regime in miniemulsion polymerization for the formation of MMA nanodroplets by high-pressure homogenization. *Langmuir*, v. 27, n. 6, p. 2279–2285, 2011.

HEMMATI, K.; SAHRAEI, R.; GHAEMY, M. Synthesis and characterization of a novel magnetic molecularly imprinted polymer with incorporated graphene oxide for drug delivery. *Polymer*, v. 101, p. 257–268, set. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386116307406>>.

HERMANSON, G. T. Microparticles and Nanoparticles. In: HERMANSON, G. T. (Org.). *Bioconjugate chemistry*. 2. ed. Elsevier Inc., 2008. p. 582–626. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123705013#ancp3>>.

HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. 2. ed., 1992.

HIEBL, B. *et al.* Viability, morphology and function of primary endothelial cells on poly(n-butyl acrylate) networks having elastic moduli comparable to arteries. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 23, n. 7, p. 901–915, 2012.

HIGUCHI, T. Mechanism of Sustained-Action Medication. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 52, p. 1145–1149, 1963.

HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of Reaction Velocity upon Surface and Agitation: I— Theoretical Consideration. *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 23, n. 10, p. 1160–1168, 1931.

HOLTZMAN, D. M. *et al.* Tau: From research to clinical development. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, v. 12, n. 10, p. 1033–1039, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155252601630019X>>.

HOPFENBERG, H. B. Controlled Release from Erodible Slabs, Cylinders, and Spheres. In: PAUL, D. R.; HARRIS, F. W. (Org.). . *Controlled Release Polymeric Formulations*. ACS Sympos : American Chemical Society, 1976. p. 26–32. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1976-0033.ch003>>.

HUANG, L. *et al.* Nanomaterial applications for neurological diseases and central nervous system injury. *Progress in Neurobiology*, v. 157, p. 29–48, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.07.003>>.

HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>>.

HUDA, N. H. *et al.* A Stability Indicating HPLC Assay Method for Analysis of Rivastigmine Hydrogen Tartrate in Dual-Ligand Nanoparticle Formulation Matrices and Cell Transport Medium. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2018, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jamc/2018/1841937/>>.

HUGHES, L. J.; BROWN, G. L. Heterogeneous polymer systems. I. Torsional modulus studies. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 5, n. 17, p. 580–588, 1961.

ICI AMERICAS INC. *The HLB System: a time-saving guide to emulsifier selection*. ICI Americas, Incorporated, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924194>>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO/TS 80004-8:2013(en) Nanotechnologies — Vocabulary — Part 8: Nanomanufacturing processes*. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:ts:80004:-8:ed-1:v1:en:term:3.12>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

JAHROMI, L. P. *et al.* A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. *Heliyon*, v. 6, n. 2, 2020.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, n. 6, p. 438–456, jun. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>>.

JOSHI, S. A.; CHAVHAN, S. S.; SAWANT, K. K. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, in vitro and

pharmacodynamic studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, NULL, v. 76, n. 2, p. 189–199, out. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.007>>.

KANDIAH, N. *et al.* Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging*, v. Volume 12, p. 697–707, abr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5402908/pdf/cia-12-697.pdf>>.

KANG, H. *et al.* Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting. *Advanced Healthcare Materials*, v. 1901223, p. 8–15, 2019.

KATZHENDLER, I. *et al.* Modeling of Drug Release from Erodible Tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n. 1, p. 110–115, 1997.

KAUR, G.; MEHTA, S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 529, n. 1–2, p. 134–160, 2017.

KHAN, A. R. *et al.* Recent progress of drug nanoformulations targeting to brain. *Journal of Controlled Release*, v. 291, n. September, p. 37–64, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.004>>.

KIM, B. Y. S.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. W. Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 25, p. 2434–2443, 16 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0912273>>.

KIM, S. *et al.* Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, n. 3, p. 420–430, mar. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641108003810>>.

KORSMEYER, R. W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 25–35, 1983.

KOSMIDIS, K.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices. *Journal of Chemical Physics*, v. 119, n. 12, p. 6373–6377, 2003.

KOSTRZEWSKA, M. *et al.* Controlled release in hard to access places by poly(methyl methacrylate) microcapsules triggered by gamma irradiation. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 26, n. 9, p. 1059–1064, set. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pat.3532>>.

KREUTER, JORG. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 65–81, 2001.

KREUTER, JÖRG *et al.* Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, v. 10, n. 4, p. 317–325, 2002.

KREUTER, JÖRG. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 71, p. 2–14, maio 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.008>>.

KROLL, A. *et al.* Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, n. 2, p. 370–377, jun. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641108003251>>.

KUMAR, S.; KIRHA, T. J.; THONGER, T. Toxicological effects of sodium dodecyl sulfate. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 5, p. 1488–1492, 2014.

LANDFESTER, K. *et al.* Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. *Macromolecules*, v. 32, p. 5222–5228, 1999a. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 48, n. 25, p. 4488–4508, 2009.

LANDFESTER, K. *et al.* Miniemulsion Polymerization with Cationic and Nonionic Surfactants: A Very Efficient Use of Surfactants for Heterophase Polymerization. *Macromolecules*, v. 32, n. 8, p. 2679–2683, 1 abr. 1999b. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma9819438>>.

LANDFESTER, K. The Generation of Nanoparticles in Miniemulsions.

*Advanced Materials*, v. 13, n. 10, p. 765–768, maio 2001. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4095\(200105\)13:10%3C765::AID-ADMA765%3E3.0.CO;2-F](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4095(200105)13:10%3C765::AID-ADMA765%3E3.0.CO;2-F)>.

LANGENBUCHER, F. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 24, n. 12, p. 979–981, 1972.

LAPPE, S.; MULAC, D.; LANGER, K. Polymeric nanoparticles – Influence of the glass transition temperature on drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 517, n. 1–2, p. 338–347, 2017.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, v. 125, n. 1, p. 75–84, mar. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250914004710>>.

LÉMERY, E. *et al.* Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 469, p. 166–179, 2015.

LI, S.; HU, J.; LIU, B. A study on the adsorption behaviour of protein onto functional microspheres. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, n. 5, p. 531–536, 2005.

LIU, L. *et al.* Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier. *Biomaterials*, v. 29, n. 10, p. 1509–1517, 2008.

LV, G. *et al.* Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 447, p. 8–13, 2014.

MADKOUR, M.; BUMAJDAD, A.; AL-SAGHEER, F. To what extent do polymeric stabilizers affect nanoparticles characteristics? *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 270, p. 38–53, 2019.

MANGIA, L. H. R. *et al.* In situ encapsulation of rivastigmine in TAT-functionalized P(MMA-co-AA) nanoparticles through miniemulsion polymerization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 624, 5 set. 2021.

MANGIA, L. H. R.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Stabilization of Aqueous

MMA Emulsions Using Mixtures of Surfactants and Implications on MMA Miniemulsion Polymerizations. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 16, n. 6, p. 2200036, 7 dez. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mren.202200036>>.

MARTÍNEZ-MANCERA, F. D.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. L. Derivatization and spectroscopic characterization of a biopolymer based on L-lysine with D-biotin analogs:co-poly(L-lysine)-graft-(E- N -[X- D -biotinyl]- L -lysine). *Química Nova*, v. 39, n. 1, p. 44–48, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150173>>.

MAURER, J. J.; EUSTACE, D. J.; RATCLIFFE, C. T. Thermal Characterization of Poly ( acrylic acid ). *Macromolecules*, v. 20, n. 2, p. 196–202, 1987.

MENDYK, A. *et al.* KinetDS: An open source software for dissolution test data analysis. *Dissolution Technologies*, v. 19, n. 1, p. 6–11, 2012.

MENGUAL, O. *et al.* Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, n. 1–2, p. 111–123, jul. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775798006803>>.

MERCK MILLIPORE. *Ficha de dados de segurança: Span ® 80*. Disponível em: <[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Span-80,MDA\\_CHEM-840123#overview](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Span-80,MDA_CHEM-840123#overview)>.

MISHRA, V. *et al.* Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, v. 14, n. 1, p. 45–53, 2006.

MOHAMADPOUR, H. *et al.* Preparation, Optimization, and Evaluation of Methoxy Poly(ethylene glycol)- co -Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles Loaded by Rivastigmine for Brain Delivery. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 783–795, 4 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acchemneuro.9b00691>>.

MOREIRA, T. S. A. *et al.* Synthesis of nanoparticles loaded with tamoxifen by in situ miniemulsion RAFT polymerization. *Macromolecular Symposia*, v. 344, n. 1, p. 101–107, 2014.

MOUT, R. *et al.* Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine.

*Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2539, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15294k>>.

MULLER, T. Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 3, n. 2, p. 211–218, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem Compound Summary for CID 77991, Rivastigmine*. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivastigmine>>. Acesso em: 15 set. 2022.

NGAMWONGSATIT, P. *et al.* WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*, v. 73, n. 3, p. 211–215, 2008.

NIKEZIĆ, A. V. V.; BONDŽIĆ, A. M.; VASIĆ, V. M. Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 151, n. January, 2020.

NIKOLAIDIS, A. K.; ACHILIAS, D. S. Thermal degradation kinetics and viscoelastic behavior of poly(methyl methacrylate)/ organomodified montmorillonite nanocomposites prepared via in situ bulk radical polymerization. *Polymers*, v. 10, n. 5, 2018.

NIU, X.; CHEN, J.; GAO, J. Nanocarriers as a powerful vehicle to overcome blood-brain barrier in treating neurodegenerative diseases: Focus on recent advances. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, n. 5, p. 480–496, 2019.

NOGUEIRA, M. H. *et al.* Physico-chemical stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase as a function of acidic pH. *Food Structure*, v. 19, p. 100103, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221332911730148X>>.

OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* In-Situ Incorporation of Amoxicillin in PVA/PVAc-co -PMMA Particles during Suspension Polymerizations. *Macromolecular Symposia*, v. 299–300, n. 1, p. 34–40, jan. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/masy.200900144>>.

OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* In Situ Incorporation of Doxorubicin in Copolymer Particles During Suspension Polymerization. *Macromolecular Symposia*, v. 319, n. 1, p.

23–33, set. 2012a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/masy.201100249>>.

OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* Suspension Copolymerization of Vinyl Acetate and Methyl Methacrylate in the Presence of Amoxicillin. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 6, n. 6–7, p. 280–292, jul. 2012b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mren.201100083>>.

OLLER-SALVIA, B. *et al.* Blood-brain barrier shuttle peptides: An emerging paradigm for brain delivery. *Chemical Society Reviews*, v. 45, n. 17, p. 4690–4707, 2016.

OMAR, S. H. *et al.* Bioinspired lipid-polysaccharide modified hybrid nanoparticles as a brain-targeted highly loaded carrier for a hydrophilic drug. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 483–494, dez. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020345281>>.

PAIVA, T.; MELO, P.; PINTO. Comparative Analysis of Sunscreen Nanoencapsulation Processes. *Macromolecular Symposia*, v. 368, n. 1, p. 60–69, 2016.

PAPADOPOULOU, V. *et al.* On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PARDO-MORENO, T. *et al.* Therapeutic Approach to Alzheimer’s Disease: Current Treatments and New Perspectives. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 6, p. 1117, 2022.

PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, v. 190, p. 3–8, set. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002508>>.

PARK, S. H.; CHOI, H. K. The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 321, n. 1–2, p. 35–41, 2006.

PAROUTI, S. *et al.* A Comprehensive Experimental Investigation of the Methyl Methacrylate/Butyl Acrylate/Acrylic Acid Emulsion Terpolymerization. *Polymer Reaction Engineering*, v. 11, n. 4, p. 829–853, 31 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/PRE-120026375>>.

PASCAUD, K. *et al.* Pickering emulsion as template for porous bioceramics in the perspective of bone regeneration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*

*Engineering Aspects*, v. 643, n. February, 2022.

PATEL, K. C.; GOLI, D. Formulation development, systematic optimization of PLGA-CS-Tween 80 nanoparticles of Rivastigmine Tartrate for treatment of Alzheimer's disease. *Der Pharmacia Lettre*, v. 7, n. 7, p. 307–320, 2015.

PATEL, K. C.; GOLI, D. Formulation preparation, characterization, optimization, behavior and histological evaluation of brain hippocampus for brain targeted PLGA-Soya lecithin-Tween 80 nanoparticles in an Alzheimer's disease model. *Der Pharmacia Lettre*, v. 8, n. 1, p. 102–120, 2016.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.

PEIXOTO, A. C. B. *Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas para Liberação de Medicamentos Sítio-Dirigida*. 2013. 173 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

PEIXOTO, A. C. B. *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, p. 60–71, 2016.

PELAZ, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, v. 11, n. 3, p. 2313–2381, 2017.

PETERSON, J. D.; VYAZOVKIN, S.; WIGHT, C. A. Stabilizing effect of oxygen on thermal degradation of poly(methyl methacrylate). *Macromolecular Rapid Communications*, v. 20, n. 9, p. 480–483, 1999.

PIAZZA, J. *et al.* Haloperidol-loaded intranasally administered lectin functionalized poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L)-lactic-co-glycolic acid (PEG-PLGA) nanoparticles for the treatment of schizophrenia. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 87, n. 1, p. 30–39, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.02.007>>.

PICHOT, C. Recent developments in the functionalization of latex particles. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, v. 35–36, n. 1, p. 327–347, 1990.

QIAN, J.; BERKLAND, C. Drug Release Kinetics from Nondegradable Hydrophobic Polymers Can Be Modulated and Predicted by the Glass Transition

Temperature. *Advanced Healthcare Materials*, v. 10, n. 12, p. 1–8, 2021.

RAO, B. M. *et al.* A stability indicating LC method for Rivastigmine hydrogen tartrate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, n. 1, p. 57–63, 2005.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd. , 2011

RAVAL, A.; PARIKH, J.; ENGINEER, C. Mechanism of controlled release kinetics from medical devices. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27, n. 2, p. 211–225, 2010.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. Â. DE. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. *Quimica Nova*, v. 30, n. 4, p. 1026–1031, 2007.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 1, p. 23–36, jun. 1987a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365987900344>>.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987b.

ROMERO-CASTILLO, L.; POSADAS, I.; CEÑA, V. Exploring the in vivo toxicity of nanoparticles. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 95, n. 9, p. 917–926, set. 2017. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjc-2017-0203>>.

ROMPICHERLA, S. K. L. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of nasal liposome and nanoparticle based rivastigmine formulations in acute and chronic models of Alzheimer's disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 394, n. 8, p. 1737–1755, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00210-021-02096-0>>.

RÖSLER, M. *et al.* Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: International randomised controlled trial. *British Medical Journal*, v. 318, n. 7184, p. 633–640, 1999.

SALATIN, S. *et al.* Thermosensitive in situ nanocomposite of rivastigmine

hydrogen tartrate as an intranasal delivery system: Development, characterization, ex vivo permeation and cellular studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 159, p. 629–638, nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776517305465>>.

SALATIN, SARA *et al.* An Alternative Approach for Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance in PLGA Nanoparticles by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, v. 13, n. 4, 2 dez. 2018. Disponível em: <<https://brief.land/jjnpp/articles/12873.html>>.

SALATIN, SARA *et al.* Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 12, n. 1, p. 1, 2017. Disponível em: <<http://www.rpsjournal.net/text.asp?2017/12/1/1/199041>>.

SALATIN, SARA *et al.* Formulation and Evaluation of Eudragit RL-100 Nanoparticles Loaded In-Situ Forming Gel for Intranasal Delivery of Rivastigmine. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 10, n. 1, p. 20–29, 11 dez. 2019. Disponível em: <<https://apb.tbzmed.ac.ir/Article/apb-27514>>.

SANG, X. *et al.* Preparation of pH/redox dual responsive polymeric micelles with enhanced stability and drug controlled release. *Materials Science and Engineering: C*, v. 91, p. 727–733, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117336160>>.

SARAIVA, C. *et al.* Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 34–47, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>>.

SAWYER, L. C.; GRUBB, D. T. Specimen preparation methods. *Polymer Microscopy*. 2. ed. Springer-Science+Business Media, B.V., 1996. p. 83–163.

SCHACHTER, D. *The source of toxicity in CTAB and CTAB-stabilized gold nanorods*. 2013. 61 f. The State University of New Jersey, 2013.

SE THOE, E. *et al.* A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. *Life Sciences*, v. 276, n. November 2020, p. 119129, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119129>>.

SHEN, J.; BURGESS, D. J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 3, n. 5, p. 409–415, 24 out. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13346-013-0129-z>>.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, n. 2, p. 328–343, 8 dez. 2008.

SIGMA-ALDRICH. *Ficha de informação de segurança de produto químico: Albumina bovina fração v em pó.* Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/a2153>>.

SIGMA-ALDRICH. *Ficha de informação de segurança de produto químico: insulina humana recombinante.* Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/91077c>>.

SIGMA-ALDRICH BRASIL. *Ficha de dados de segurança: ÁLCOOL POLIVINÍLICO.*

SIGMA-ALDRICH BRASIL. *Ficha de dados de segurança: DODECIL SULFATO DE SÓDIO.*

SIGMA-ALDRICH BRASIL. *Ficha de dados de segurança: PLURONIC® F-127.* Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/htm>>.

SIGMA-ALDRICH BRASIL. *Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Brometo de hexadeciltrimetilamônio ácido deoxicólico sal sódico.*

SIGMA-ALDRICH BRASIL. *Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Tween 80.*

SINGH, R. *et al.* Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 86, n. 3, p. 215–223, jun. 2009. Disponível em: <<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/ec/jec7/pdf/com3-6.pdf>>.

SOARES, S. *et al.* Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, n. AUG, p. 1–15, 2018.

SON, G.-H.; LEE, B.-J.; CHO, C.-W. Mechanisms of drug release from advanced

drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 47, n. 4, p. 287–296, 3 jul. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40005-017-0320-1>>.

SONG, R. *et al.* Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 12, p. 3117–3145, 2018.

SRIVASTAVA, S.; AHMAD, R.; KHARE, S. K. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 216, p. 113320, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113320>>.

SU, H. *et al.* Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *Journal of Applied Toxicology*, v. 38, n. 1, p. 3–24, jan. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.3476>>.

TAKEUCHI, I. *et al.* Drug release behavior of hydrophobic drug-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: Effects of glass transition temperature. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 529, n. May, p. 328–333, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.080>>.

THEISINGER, S. *et al.* Encapsulation of a fragrance via miniemulsion polymerization for temperature-controlled release. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 210, n. 6, p. 411–420, 2009.

TIAN, H. *et al.* Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 37, n. 2, p. 237–280, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>>.

TORABI, S. J. *et al.* Synthesis and characterization of a novel molecularly imprinted polymer for the controlled release of rivastigmine tartrate. *Materials Science and Engineering: C*, v. 128, p. 112273, set. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493121004124>>.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Dissolution Methods*. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. *Dissolution Methods Database*. Disponível em: <<https://www.usp.org/resources/dissolution-methods-database>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

VARGÜN, E. *et al.* Synthesis and characterization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and methyl methacrylate (MMA) 1. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 47, n. 3, p. 235–240, 2010.

VENDITTI, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery : A review. *Journal of King Saud University - Science*, v. 31, n. 3, p. 398–411, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.10.004>>.

WANG, H. *et al.* Preloading of Hydrophobic Anticancer Drug into Multifunctional Nanocarrier for Multimodal Imaging, NIR-Responsive Drug Release, and Synergistic Therapy. *Small*, v. 12, n. 46, p. 6388–6397, dez. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml.201602263>>.

WAY, D. V. *et al.* Miniemulsion RAFT Copolymerization of MMA with Acrylic Acid and Methacrylic Acid and Bioconjugation with BSA. *Nanomaterials*, v. 9, n. 6, p. 828, 31 maio 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-4991/9/6/828>>.

WEI, D. *et al.* Noninvasive monitoring of nanoparticle clearance and aggregation in blood circulation by in vivo flow cytometry. *Journal of Controlled Release*, v. 278, n. March, p. 66–73, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.024>>.

WESTMEIER, D.; STAUBER, R. H.; DOCTER, D. The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 299, p. 53–57, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.008>>.

WILSON, B. *et al.* Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research*, v. 1200, p. 159–168, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dementia*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 4 dez. 2019.

XIN, X. *et al.* Influence of CTAB and SDS on the properties of oil-in-water nano-

emulsion with paraffin and span 20/Tween 20. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 418, p. 60–67, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.10.065>>.

YAO, F.; WEIYUAN, J. K. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non- degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opinion Drug Delivery*, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.

YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, v. 6, n. 1, p. 19–33, 15 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

YU, M. *et al.* Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. *Journal of Controlled Release*, v. 315, n. May, p. 23–30, 2019.

YUAN, C. L. *et al.* Study on characteristics and harm of surfactants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 7, p. 2233–2237, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Biocompatible and degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based polymers for biomedical applications. *Polymer Chemistry*, v. 3, n. 10, p. 2752–2759, 2012.

ZOU, L.-L. *et al.* Cell-penetrating Peptide-mediated therapeutic molecule delivery into the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 2, p. 197–208, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3637673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ZVĚŘOVÁ, M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*, v. 72, p. 3–6, 2019.

## Apêndice 1. Dados de TSI, $\mu_{\text{cla}}$ e $\mu_{\text{cre}}$ da etapa “Escolha de Surfactante”

Os valores calculados para TSI,  $\mu_{\text{cla}}$  e  $\mu_{\text{cre}}$  da análise realizada no equipamento Turbiscan Lab<sup>®</sup> estão dispostos na tabela abaixo.

Tabela Apêndice 1. Valores de TSI e taxas de cremeação e clarificação obtidos no estudo de surfactantes.

		Surfactantes						
		SDS	CTAB	Pluronic	Tween 80	Span 80	Pectina	PVA
1% surf_ 10% MMA	TSI	23,01	19,71	5,80	6,44	7,03	11,48	6,80
	$\mu_{\text{cla}}$ (mm/h)	135,25	139,85	3,47	14,52	24,47	55,05	11,35
	$\mu_{\text{cre}}$ (mm/h)	54,82	64,72	6,62	12,03	12,92	19,66	25,27
1% surf_ 25% MMA	TSI	19,22	19,01	17,02	5,55	7,41	9,39	8,20
	$\mu_{\text{cla}}$ (mm/h)	93,63	54,78	20,91	4,75	17,58	21,49	15,29
	$\mu_{\text{cre}}$ (mm/h)	15,72	62,99	14,40	7,72	31,83	24,81	62,43
5% surf_ 10% MMA	TSI	14,82	18,75	14,68	3,09	4,90	4,10	4,93
	$\mu_{\text{cla}}$ (mm/h)	24,42	131,17	102,25	8,48	22,67	19,15	23,54
	$\mu_{\text{cre}}$ (mm/h)	14,85	24,75	18,01	8,01	9,90	9,80	7,74
5% surf_ 25% MMA	TSI	19,94	19,94	18,52	3,29	4,44	1,22	4,54
	$\mu_{\text{cla}}$ (mm/h)	60,90	56,70	59,67	3,81	7,05	21,88	4,11
	$\mu_{\text{cre}}$ (mm/h)	3,00	30,58	14,65	9,84	8,97	32,14	22,40

## Apêndice 2. Dados de TSI, $\mu_{cla}$ , $\mu_{cre}$ e índice de clarificação da etapa “Efeito do número HLB”

Os valores calculados para TSI,  $\mu_{cla}$ ,  $\mu_{cre}$  e índice de clarificação (IOC) estão dispostos na tabela abaixo.

Tabela Apêndice 2. Valores de TSI, taxas de cremação e clarificação e índice de clarificação obtidos no estudo de determinação de HLB.

		HLB						
		4,3	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	15,0
1% m/m	TSI	13,58	3,41	5,77	3,53	3,38	3,56	4,25
	IC (%)	75,00	9,52	5,00	3,00	2,00	2,00	9,80
	$\mu_{cla}$ (mm/h)	36,28	6,78	10,72	16,03	7,41	7,60	6,96
	$\mu_{cre}$ (mm/h)	19,56	14,92	10,70	14,64	6,03	0,54	5,56
3% m/m	TSI	8,97	3,82	3,70	3,92	3,95	5,21	5,29
	IC (%)	26,55	4,35	3,42	2,59	2,73	1,77	8,70
	$\mu_{cla}$ (mm/h)	22,22	7,28	5,09	8,62	5,16	5,88	4,53
	$\mu_{cre}$ (mm/h)	23,30	11,85	7,65	6,94	11,67	7,23	13,59
5% m/m	TSI	3,55	3,46	3,50	4,47	3,40	4,40	4,14
	IC (%)	11,02	5,00	2,59	3,42	3,39	3,42	3,57
	$\mu_{cla}$ (mm/h)	10,21	9,09	7,27	9,25	10,34	11,43	10,53
	$\mu_{cre}$ (mm/h)	8,63	9,08	5,78	11,74	17,57	14,16	7,60

### Apêndice 3. Ensaio de solubilidade de rivastigmina

Um ensaio de solubilidade de rivastigmina base livre foi preparado para verificar a influência da adição de SP80 e TW80 no aumento de solubilidade aquosa do fármaco. Partindo de um bécher contendo 25 %m/m de MMA em água, foi adicionado 1 %m/m de fármaco em relação à fase orgânica. Após agitação magnética de 5 min, uma alíquota da fração aquosa foi retirada e a concentração de fármaco foi medida em espectroscopia UV (P1). Sequencialmente, alíquotas de SP80 foram adicionadas ao meio e o processo de agitação magnética e leitura em UV foi repetido (P2 a P7). Após adicionar 2 %m/m em relação a fração orgânica de SP80, o mesmo processo foi repetido para o TW80 (P8 a P13). Assim, foi plotado um gráfico relacionando a concentração aquosa do fármaco e a concentração dos surfactantes no meio.

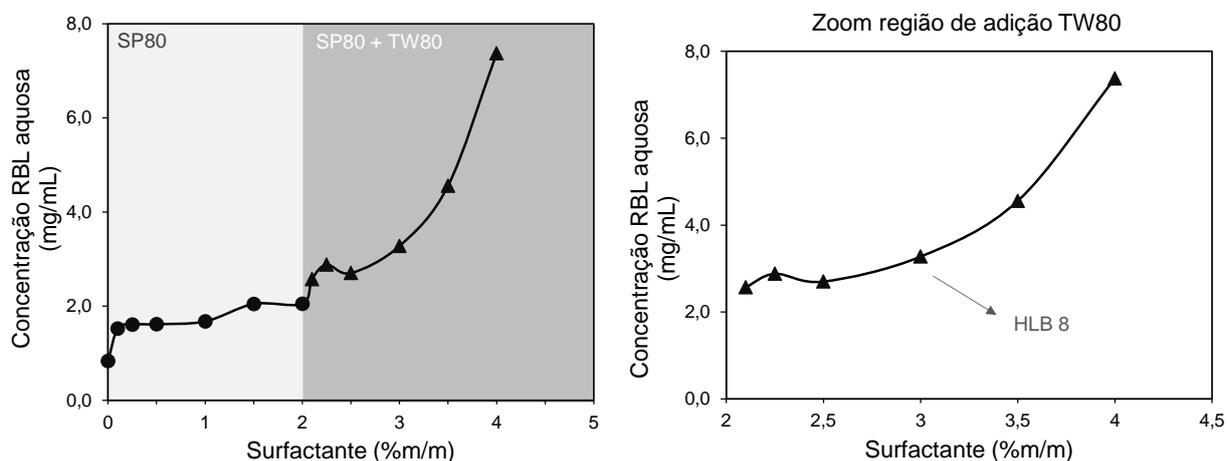


Figura Apêndice 1. Concentração aquosa de rivastigmina base livre em ensaio de solubilidade com adição de Span 80 e Tween 80 no meio.

De acordo com a Figura Apêndice 1, conseguiu-se notar que a adição de SP80 pode aumentar a solubilidade do fármaco no meio, mas TW80 possui uma influência maior. Na proporção de SP80 e de TW80 correspondente ao valor HLB8, notou-se um salto significativo do fármaco na fração aquosa. Dessa forma, confirmou-se que a presença dos surfactantes, em especial de TW80, aumentou a solubilidade de rivastigmina base livre no meio aquoso.

## Apêndice 4. Comparação entre os espectros de $^1\text{H}$ -RMN de BA, HEMA e P(MMA-BA-HEMA)

A identificação e quantificação de HEMA e de BA é realizada por meio do sinal entre  $\delta=3,8$  e  $4,2$  ppm relativo à ligação O-CH<sub>2</sub> de acordo com a literatura (EROLA *et al.*, 2015; VARGÜN *et al.*, 2010). Entretanto, levando em consideração o terpolímero, contendo ambos os monômeros, a identificação fica restrita. Por isso foi realizada uma comparação de espectros  $^1\text{H}$  preditos de cada monômero utilizando o software MestReNova, para investigar as contribuições individuais.

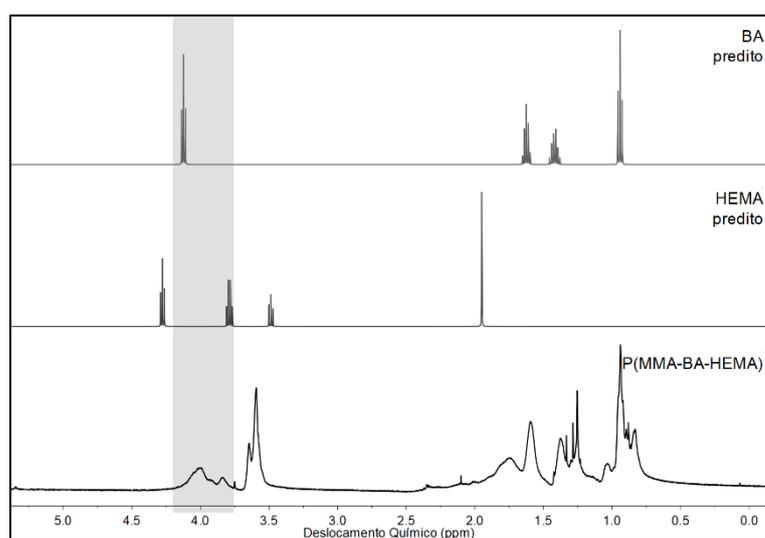


Figura Apêndice 2. Comparação espectros  $^1\text{H}$ -RMN do copolímero P(MMA-BA-HEMA) com os espectros preditos de BA e HEMA.

A Figura Apêndice 2 indica em cinza a região usada para identificação dos monômeros. Ao compararmos o espectro de P(MMA-BA-HEMA) com os dos preditos, identificou-se uma proximidade entre os sinais, com forte possibilidade de acoplamento de picos. Por isso, a identificação assertiva da contribuição individual de cada um foi impossibilitada. Por isso, para os cálculos quantitativos, foi considerada como uma contribuição dos dois monômeros na região de análise.

## Apêndice 5. Composição dos copolímeros por $^1\text{H}$ -RMN

O cálculo da composição molar média ( $F_i$ ) do copolímero foi realizado a partir do espectro  $^1\text{H}$ -RMN relacionando a área integrada relativa a cada material conforme a equação abaixo:

$$F_{MMA} = \frac{A_{MMA}/3}{A_{MMA}/3 + A_B/x} = 1 - F_B$$

Onde A é o valor da integral nos intervalos entre  $\delta=3,30$  e  $3,75$  ppm (O-CH<sub>3</sub> de MMA) para identificar o MMA ( $A_{MMA}$ ). Já o valor da integral de  $A_B$  é variado dependendo do comonômero B. Ela é realizada entre  $\delta=3,30$  e  $3,75$  ppm para identificar O-CH<sub>2</sub> do BA e/ou do HEMA, e entre  $\delta=2,3$ - $2,6$  ppm para identificar o CH do AA. As integrais  $A_{MMA}$  e  $A_B$  são respectivamente divididas pelo número de prótons (x) envolvido no sinal: 3 para MMA, 2 para BA e/ou HEMA, e 1 para AA (CAMPOS *et al.*, 2016; EROLA *et al.*, 2015; VARGÜN *et al.*, 2010).

A fração mássica média do copolímero foi determinada usando a equação abaixo:

$$w_{MMA} = \frac{F_{MMA} \times MM_{MMA}}{F_{MMA} \times MM_{MMA} + F_B \times MM_B} = 1 - w_B$$

Sendo  $F_B$  a composição molar média e  $MM_B$  a massa molar do monômero B.

## Apêndice 6. Tg dos copolímeros calculados pelo espectro de DSC

Os copolímeros foram submetidos à análise DSC para verificação de mudança de temperatura de transição vítrea com a introdução do comonômeros BA. Para alguns casos, incongruências com os valores esperados e/ou inconclusão das análises levaram à repetição das caracterizações. A Figura Apêndice 3 ilustra essas situações com os espectros gerados pelo equipamento de análise para P(MMA-BA)40%, relatando três situações distintas, e para P(MMA-BA)\_R, com resultado inconclusivo. Esses espectros ilustram a necessidade de repetição das análises para alguns materiais e indicam a elevada heterogeneidade das amostras e/ou técnica de amostragem.

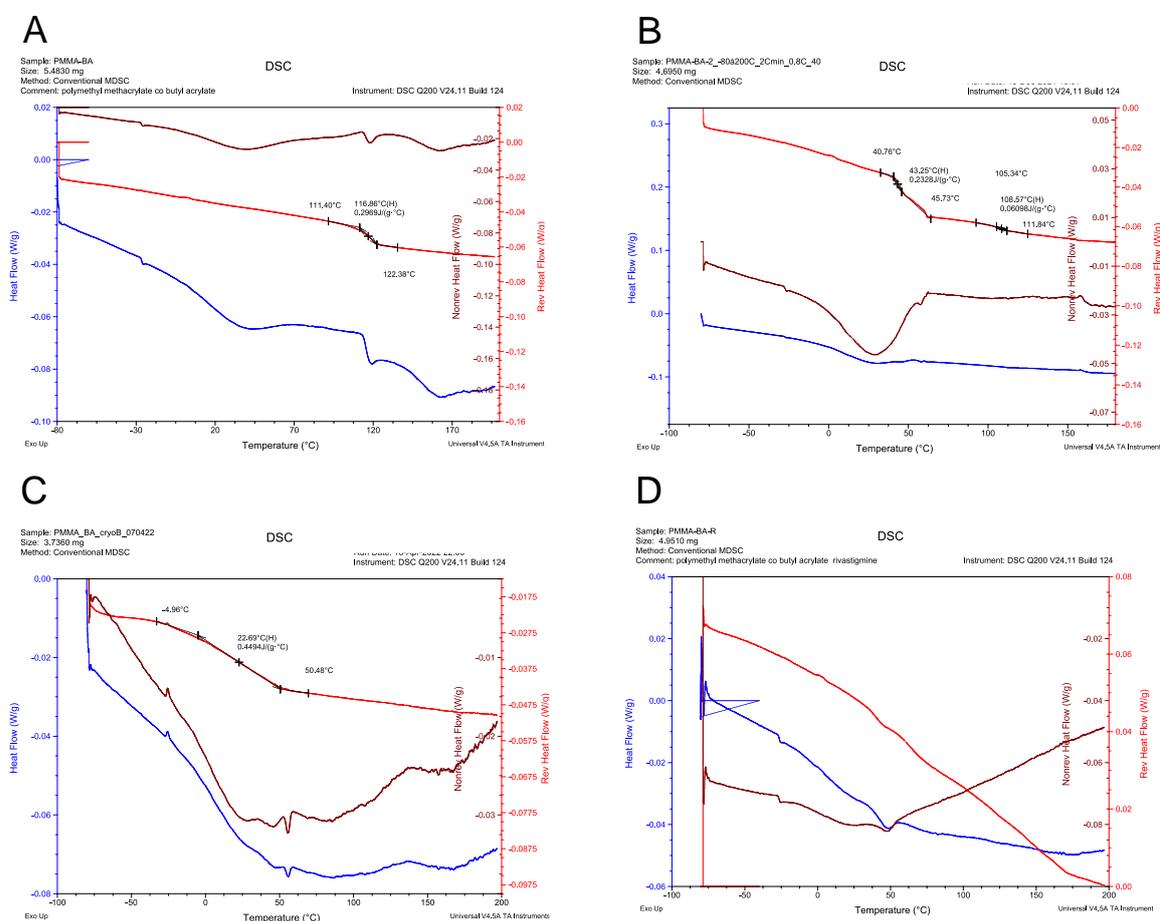


Figura Apêndice 3. Espectros DSC gerados pelo equipamento indicando Tg acima de 100oC (A), duas Tg's (B) e Tg abaixo de 50oC (C) para P(MMA-BA)40%, e resultado inconclusivo para P(MMA-BA)\_R (D).

Os valores de Tg calculados a partir dos espectros DSC dos materiais estão dispostos na Tabela Apêndice 3.

Tabela Apêndice 3. Valores de Tg obtidos na caracterização experimental por DSC para o homopolímero controle, os copolímeros contendo BA e formulações contendo fármaco encapsulado.

<b>Amostra</b>	<b>Tg (°C) 1ª leitura</b>	<b>Tg (°C) 2ª leitura</b>	<b>Tg (°C) 3ª leitura</b>	<b>Tg (°C) 4ª leitura</b>
PMMA_HLB6	113,00			
P(MMA-BA)40%	116,86	43,25 108,57	22,69	21,96
P(MMA-BA-HEMA)	21,33			
P(MMA-BA-AA)	19,74			
PMMA_R	114,52			
P(MMA-AA)_R	19,36	116,03		
P(MMA-BA)_R	Não conclusivo	54,28	28,07	
P(MMA-BA-HEMA)_R	44,47	54,28		
P(MMA-BA-AA)_R	114,81	17,38	15,80	

## Apêndice 7. Cálculo teórico de Tg a partir da regra da aditividade e da equação de Fox

Algumas leis desenvolvidas por conceitos termodinâmicos podem ser aplicadas para prever o valor da Tg de um copolímero ( $Tg^{copolim}$ ) (CANEVAROLO JR., 2006). Aqui, os cálculos foram feitos a partir da regra de aditividade e da equação de Fox como descrito abaixo:

Regra da aditividade:

$$Tg^{copolímero} = \sum F_i \times Tg_i$$

Equação de Fox:

$$\frac{1}{Tg^{copolímero}} = \sum \frac{F_i}{Tg_i}$$

Sendo:  $F_i$  a composição molar teórica do comonômero “i” e  $Tg_i$  o valor da temperatura de transição vítrea em kelvin do homopolímero formado pelo comonômero “i”.

Os valores de Tg para os homopolímeros utilizados foram:  $Tg_{PMMA} = 105^\circ\text{C}$ ,  $Tg_{PAA} = 115^\circ\text{C}$  (média dos valores de 105 a 125°C encontrados na literatura),  $Tg_{PBA} = -54^\circ\text{C}$  e  $Tg_{PHEMA} = 81^\circ\text{C}$  (HUGHES; BROWN, 1961; MAURER *et al.*, 1987; VARGÜN *et al.*, 2010)

## Apêndice 8. Quantificação de RBL por HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresenta elevada sensibilidade para identificação e quantificação de substâncias, justificando o seu uso neste trabalho nos ensaios de liberação *in vitro*. A Figura Apêndice 4 apresenta os cromatogramas obtidos pelo software do equipamento, representando todas as condições analisadas: solução de rivastigmina em tampão PBS, usada para construção de curva padrão (A), alíquota do ensaio de controle de fármaco (B), e alíquota de ensaio conduzido com látex (C). A sobreposição de região de identificação mostra a adequabilidade desta instrumentação para identificação do fármaco neste meio.

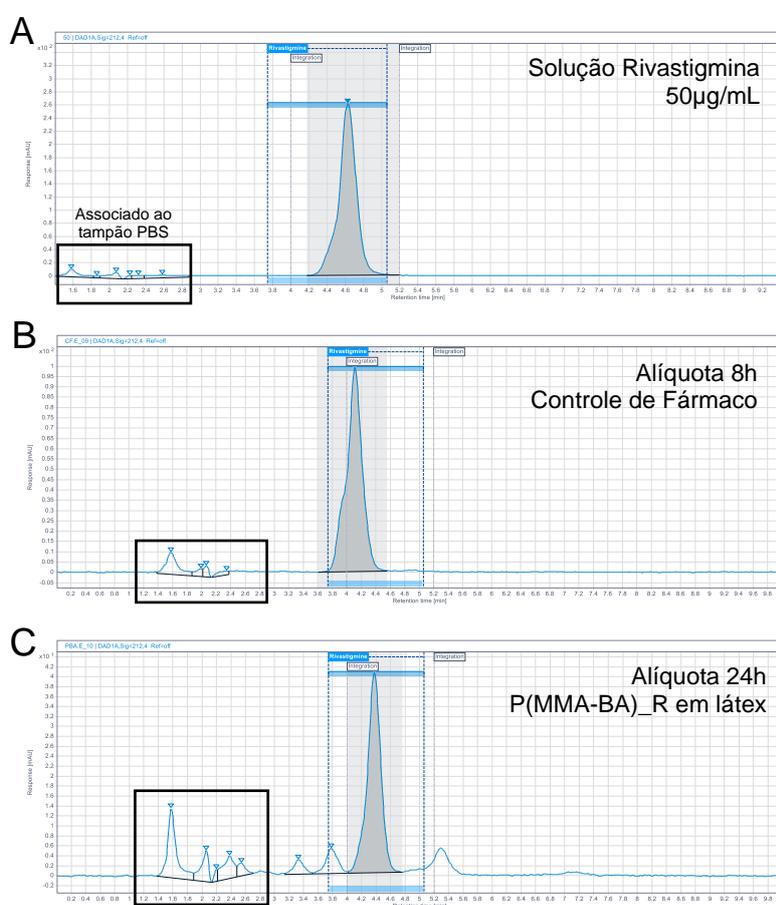


Figura Apêndice 4. Cromatogramas obtidos para solução padrão do fármaco em meio tampão (A), alíquota ensaio controle de fármaco após 8h de ensaio (B) e alíquota P(MMA-BA)\_R ensaio conduzido com látex após 24h (C).

A Figura Apêndice 5 apresenta a curva padrão calculada pelo software do equipamento de HPLC a partir de soluções de concentração conhecida de RBL em tampão PBS, meio de liberação usado nos ensaios de liberação *in vitro*. A elevada correlação observada ( $R^2 = 0,99922$ ) indica grande confiabilidade para o uso desta técnica analítica nos cálculos de quantificação de RBL no meio.

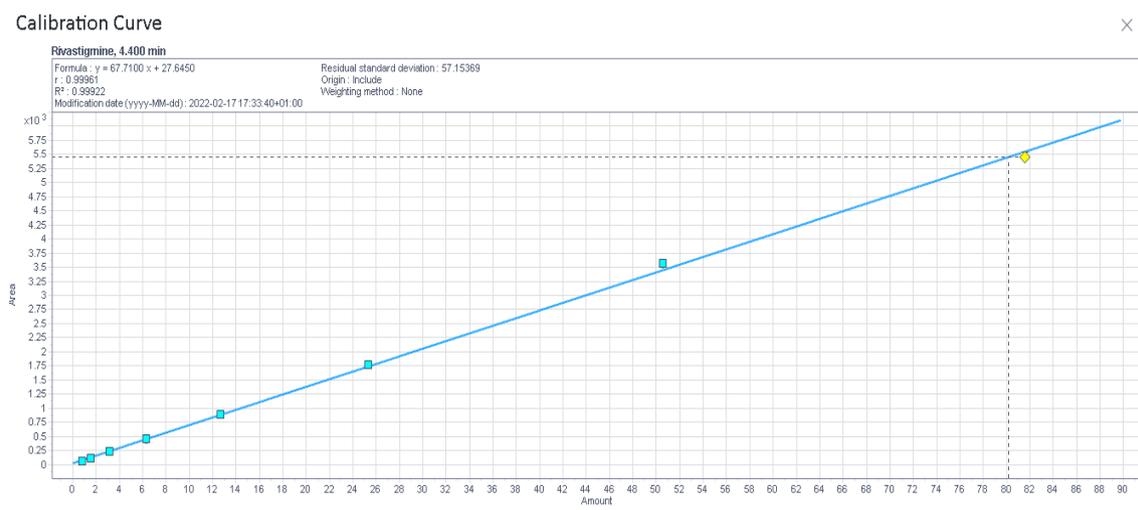


Figura Apêndice 6. Curva de calibração de RBL em meio tampão PBS calculada utilizando técnica de HPLC.

## Apêndice 9. Dados RBL liberada no ensaio de liberação *in vitro*

A Tabela Apêndice 4 apresenta o percentual de rivastigmina base livre liberada após 24h dos ensaios de liberação antes e após saturação do filtro de seringa. Um comparativo dos dados é apresentado na Figura Apêndice 7 para os ensaios conduzidos com amostra em látex (A) e liofilizada (B). Os dados indicam que após a saturação do filtro de seringa, foram obtidos um aumento médio de até 5% no percentual de liberação final, com algumas sobreposições de desvio padrão, indicando baixa tendência de adsorção do fármaco no filtro.

Tabela Apêndice 4. Percentuais de liberação de RBL calculados antes e após a saturação de filtro de seringa, em 24h de ensaio.

	Nanopartículas em látex		Nanopartículas liofilizadas	
	liberado $\pm$ desvio padrão (%)		liberado $\pm$ desvio padrão (%)	
	24h de ensaio	Após saturação de filtro	24h de ensaio	Após saturação de filtro
PMMA_R	15,54 $\pm$ 2,06	16,09 $\pm$ 1,91	27,24 $\pm$ 0,33	29,10 $\pm$ 0,63
P(MMA-AA)_R	71,94 $\pm$ 0,65	74,98 $\pm$ 1,08	53,05 $\pm$ 1,27	57,92 $\pm$ 1,89
P(MMA-BA)_R	30,61 $\pm$ 2,59	32,43 $\pm$ 3,48	68,75 $\pm$ 3,34	73,99 $\pm$ 1,80
P(MMA-BA-AA)_R	31,27 $\pm$ 22,67*	46,43 $\pm$ 2,66	67,64 $\pm$ 0,27	69,11 $\pm$ 0,18
P(MMA-BA-HEMA)_R	19,93 $\pm$ 0,65	20,69 $\pm$ 0,64	29,70 $\pm$ 1,09	34,10 $\pm$ 1,18

\*desvio associado à uma triplicata experimental

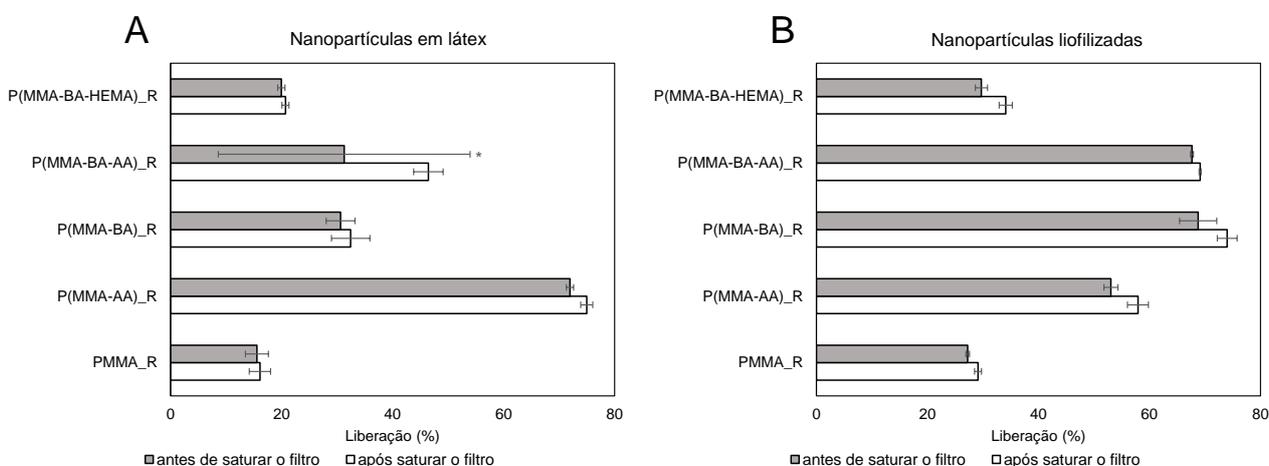


Figura Apêndice 7. Comparativo de percentual de fármaco liberado após 24h de ensaio *in vitro* antes e após saturação do filtro de seringa para ensaios com nanopartícula em látex (A) e liofilizada (B). \*desvio padrão associado à triplicata experimental.

## **Apêndice 10. Modelos matemáticos, métricas de qualidade de ajuste e eficiências de dissolução aplicados aos dados experimentais da liberação *in vitro* de RBL**

A Tabela Apêndice 5 apresenta os modelos matemáticos aplicados para o estudo da liberação *in vitro* de RBL, com os respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), e as eficiências de dissolução calculadas pelo software KinetDS utilizando os dados experimentais dos ensaios de liberação *in vitro* de RBL.

Tabela Apêndice 5. Modelos matemáticos, coeficientes de ajuste, eficiência de dissolução aplicados para os ensaios de liberação *in vitro* de RBL.

Nanopartículas em látex								
	Eficiência	Ordem 0	Ordem 1	Baker-Lonsdale	Hickson-Crowell	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Weibull
	de Dissolução (%)	$Q = k \cdot t + Q_0$	$Q = Q_0 e^{k \cdot t}$	$k_{BL} \cdot t = \frac{2}{3} \cdot \left[ 1 - \left( 1 - \frac{Q}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{Q}{100}$	$Q^{1/3} = k \cdot (t - t_{lag}) + Q_0^{1/3}$	$Q = k \cdot \sqrt{t}$	$Q = k \cdot t^n$	$Q = 100 \cdot \left( 1 - \exp \left[ \frac{-(t)^b}{a} \right] \right)$
		R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
PMMA_R	14,27	0,432	0,071	0,571	0,216	0,362	0,950	0,952
P(MMA-AA)_R	62,10	0,584	0,096	0,769	0,350	0,458	0,974	0,984
P(MMA-BA)_R	26,11	0,642	0,106	0,571	0,389	0,566	0,979	0,982
P(MMA-BA-AA)_R	32,16	0,252	0,072	0,203	0,192	0,204	0,959	0,963
P(MMA-BA-HEMA)_R	18,42	0,455	0,093	0,555	0,277	0,448	0,974	0,976

Continuação...

**Nanopartículas liofilizadas**

	Eficiência de Dissolução (%)	Ordem 0 $Q = k \cdot t + Q_0$ R <sup>2</sup>	Ordem 1 $Q = Q_0 e^{k \cdot t}$ R <sup>2</sup>	Baker-Lonsdale $k_{BL} \cdot t = \frac{2}{3} \cdot \left[ 1 - \left( 1 - \frac{Q}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{Q}{100}$ R <sup>2</sup>	Hickson-Crowell $Q^{1/3} = k \cdot (t - t_{lag}) + Q_0^{1/3}$ R <sup>2</sup>	Higuchi $Q = k \cdot \sqrt{t}$ R <sup>2</sup>	Korsmeyer- Peppas $Q = k \cdot t^n$ R <sup>2</sup>	Weibull $Q = 100 \cdot \left( 1 - \exp \left[ \frac{-(t)^b}{a} \right] \right)$ R <sup>2</sup>
PMMA_R	23,24	0,560	0,091	0,730	0,316	0,572	0,971	0,974
P(MMA-AA)_R	46,59	0,545	0,090	0,700	0,321	0,496	0,969	0,977
P(MMA-BA)_R	55,74	0,642	0,120	0,880	0,386	0,279	0,984	0,989
P(MMA-BA-AA)_R	60,38	0,525	0,096	0,627	0,341	0,416	0,974	0,984
P(MMA-BA-HEMA)_R	21,28	0,801	0,196	0,963	0,507	-0,408	0,659	0,660