



NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Izabella Maria Ferreira Campos Ramos

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.

Orientador(es): Helen Conceição Ferraz
José Carlos Costa da
Silva Pinto

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO DE
FÁRMACO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Izabella Maria Ferreira Campos Ramos

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^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

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

Prof^a. Claudia Pinto Figueiredo, D.Sc.

Prof^a. Aurora Pérez Gramatges, D.Sc.

Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2018

Campos-Ramos, Izabella Maria Ferreira

Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central / Izabella Maria Ferreira Campos Ramos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XXIII, 217 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 163-178

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

DEDICATÓRIA

A meus pais, Ricardo e Marilene, por sempre me incentivarem e apoiarem em todos os momentos e decisões.

A minha querida avó Alice, minha inspiração, que por muitos anos conviveu com a doença de Alzheimer e tanto nos ensinou.

AGRADECIMENTOS

A finalização desta tese não significa o encerramento da jornada no mundo da pesquisa. Na conclusão desta etapa, gostaria de agradecer imensamente a todos aqueles que participaram junto comigo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao PEQ/COPPE/UFRJ, por me proporcionar a oportunidade de qualificação e desenvolvimento em minha profissão.

A meus orientadores, professora Helen e professor José Carlos, pela dedicação, disponibilidade para discussões e ensinamentos. Por sempre abraçarem a nossa causa e nos inspirarem. Espero nesta caminhada ter conseguido absorver um pouco dessas qualidades e que possa levá-las adiante.

Aos professores Príamo e Márcio, pelas orientações, dicas e discussões durante os seminários de acompanhamento.

Ao professor Marcelo Lenzi, por me receber em Curitiba e abrir as portas dos Laboratórios do Programa de Engenharia Química da UFPR, disponibilizando o uso dos equipamentos e local de trabalho. Ao Ivan, pela disponibilidade e ajuda nos ensaios no HPLC.

Às professoras Cláudia Figueiredo e Yraima Cordeiro, pela disponibilidade, imensa ajuda nos testes conduzidos no Núcleo de Neurociências e no LaBIME e por seu comprometimento e dedicação ao desenvolvimento dos trabalhos. À Melissa, com sua alegria contagiante e disposição em ajudar e ensinar os procedimentos durante os experimentos.

À professora Mirian Pereira e Renata (Fiocruz), pela ajuda nos testes de toxicidade e permeabilidade *in vitro*.

A Larissa, Natalie, Rhana e Natasha, pelas inúmeras análises no EngePol. Sem vocês, o nosso laboratório não funcionaria!

A Eduardo Dominguez, pelas análises e discussões sobre RMN e por sempre me receber tão bem no IMA/UFRJ.

A Thais e Beth, por cederem a utilização de equipamentos no PAM e pelas análises de MEV e DSC.

Ao Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), por realizar as análises das partículas por MET.

A Luís Fernando do Departamento de Histologia do Hospital Universitário da UFRJ, pelos cortes histológicos realizados.

Aos primeiros amigos do PEQ e companheiros de disciplinas, Jana, Fran, Leandro, Vinícius, Eduardo e Alberth. Alguns tomaram outros rumos e outros continuam pelos corredores. O apoio de vocês foi essencial!

Ao melhor grupo de todos os tempos, no momento Nerds&Divas, Thamis, Debs, Lu, Ray, Mari e Maíra, pelas inúmeras discussões acadêmicas, filosóficas e temáticas, seja ao vivo ou pela internet, e por tornarem os dias mais divertidos! Obrigada por me abrigarem inúmeras vezes e por me fazerem sentir que mesmo longe eu estava com vocês! Que esta amizade continue sempre forte!

A TODOS os amigos do I-140 e EngePol, pelos bons momentos no laboratório, inúmeras discussões e aprendizagem. Por tornarem o nosso local de trabalho mais divertido!

Aos amigos do Grift, João, Carla, Amanda, Anderson, Eduardo e Natália, pela adorável convivência e aprendizado. Por tornarem a caminhada mais leve e prazerosa!

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

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Izabella Maria Ferreira Campos Ramos

Fevereiro/2018

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Programa: Engenharia Química

O uso de partículas poliméricas que possam ser reconhecidas por receptores celulares pode garantir o sucesso de aplicações de liberação *in situ* de fármacos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas poliméricas funcionalizadas e capazes de permear as células da barreira hematoencefálica para entrega de fármacos, visando ao tratamento de doenças neurodegenerativas. A técnica de copolimerização em miniemulsão permitiu a produção de partículas nanométricas a partir dos monômeros metacrilato de metila, ácido acrílico e ácido metacrílico para posterior funcionalização, com tamanho médio em torno de 60 a 100 nm. Além disso, comprovou-se o encapsulamento do fármaco clioquinol com eficiência maior que 90%. A metodologia de imobilização por reação química, com 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) carbodiimida, foi capaz de promover a funcionalização das partículas com a inserção do peptídeo *trans-activating transcription factor*. O material produzido foi avaliado quanto a capacidade de transposição à barreira encefálica por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram que as partículas produzidas são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica com sucesso, tendo sido encontradas no tecido cerebral de camundongos. Devido à natureza não seletiva do peptídeo modelo utilizado, as nanopartículas também atravessam outros tecidos, sendo encontradas em outros órgãos. O tempo de meia-vida nos animais é pequeno, sendo removidos da circulação após 30 minutos.

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

FUNCTIONALIZED POLYMER NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY IN THE
CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Izabella Maria Ferreira Campos Ramos

February/2018

Advisors: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

The use of polymer particles that can be recognized by cellular receptors can ensure the success of in situ drug delivery applications. Thus, the objective of this work is to develop functionalized polymer nanoparticles capable of permeating blood-brain barrier cells for drug delivery, aiming at the treatment of neurodegenerative diseases. The technique of copolymerization in miniemulsion allowed the production of nanometric particles from the monomers methyl methacrylate, acrylic acid and methacrylic acid for later functionalization, with average size around 60 to 100 nm. In addition, the encapsulation of clioquinol with an efficiency greater than 90% was proven. The methodology of immobilization by chemical reaction, with 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide, was able to promote the functionalization of the particles with the insertion of the peptide *trans-activating transcription*. The produced material was evaluated in terms of the ability to transverse the brain barrier by means of *in vitro* and *in vivo* tests. The results showed that the particles produced can penetrate the blood-brain barrier successfully, having been found in the brain tissue of mice. Due to the non-selective nature of the model peptide used, the nanoparticles also cross other tissues, being found in other organs. The half-life in the animals is small, being removed from the circulation after 30 minutes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxii
<i>Capítulo I</i>	1
INTRODUÇÃO	1
1.1 MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	2
1.3 APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS	3
<i>Capítulo II</i>	5
REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO	5
2.1.1 Liberação modificada de fármacos.....	6
2.2 DIRECIONAMENTO DE FÁRMACOS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	8
2.2.1 A barreira hematoencefálica e o líquido cefalorraquidiano	9
2.2.2 Mecanismos de transporte através da barreira hematoencefálica.....	11
2.2.3 Principais doenças que atingem o sistema nervoso central	17
2.3 POLÍMEROS PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	18
2.3.1 Polímeros biodegradáveis.....	20
2.3.2 Polímeros não biodegradáveis.....	21
2.3.3 O poli(metacrilato de metila)	22
2.3.4 O poli(ácido acrílico) e o poli(ácido metacrílico)	23
2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	24
2.4.1 Técnicas para o preparo de nanopartículas	26
2.4.2 Polimerização por emulsão e miniemulsão	27
2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	31
2.5.1 Adsorção não específica.....	33
2.5.2 Adsorção por ligação covalente	34
2.6 FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS 36	

2.7 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO E MODELOS CINÉTICOS	40
2.8 TOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR	43
2.9 NANOPARTÍCULAS NO MERCADO	45
2.10 COMENTÁRIOS FINAIS	47
<i>Capítulo III</i>	49
MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 REAGENTES	49
3.2 EQUIPAMENTOS	52
3.3 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	54
3.3.1 Reação de polimerização em miniemulsão	54
3.3.2 Avaliação do surfactante na produção das nanopartículas	56
3.3.3 Reações de copolimerização com ácido acrílico e ácido metacrílico	57
3.3.4 Encapsulamento do fármaco clioquinol	58
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS	58
3.4.1 Potencial zeta e tamanho das partículas	59
3.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho	60
3.4.3 Ressonância magnética nuclear	60
3.4.4 Medidas de ângulo de contato e tensão interfacial	60
3.4.5 Análises térmicas	61
3.4.5 Microscopia eletrônica de varredura	62
3.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão	62
3.4.7 Conversão	63
3.4.8 Massa molar	63
3.4.9 Eficiência de encapsulamento	63
3.5 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	65
3.6 TESTES DE LIBERAÇÃO	68
3.6.1 Teste de solubilidade	70
3.6.2 Determinação e validação do método de quantificação do clioquinol por HPLC	71
3.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PERMEAÇÃO NA BHE <i>in vivo</i>	73

3.8 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DIFUSÃO <i>in vitro</i>	76
3.9 COMENTÁRIOS FINAIS	78
<i>Capítulo IV</i>	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO - NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	79
4.1 AVALIAÇÃO DO SURFACTANTE NAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	79
4.2 REAÇÕES DE COPOLIMERIZAÇÃO	83
4.2.1 Avaliação do tamanho de partícula e potencial zeta	83
4.2.2 Conversão e massa molar	86
4.2.3 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura.....	90
4.2.4 Ensaios para avaliação da copolimerização.....	91
4.3 ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO CLIOQUINOL	96
4.3.1 Estudo da concentração de fármaco nas reações de polimerização	97
4.3.2 Avaliação do tamanho de partícula e potencial zeta	106
4.3.3 Conversão e massa molar	108
4.3.4 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão.....	110
4.3.5 Análises térmicas.....	111
4.3.6 Espectros de RMN.....	113
4.3.7 Eficiência de encapsulamento do fármaco clioquinol	115
4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	116
<i>Capítulo V</i>	117
RESULTADOS E DISCUSSÃO - FUNCIONALIZAÇÃO	117
5.1 ENSAIOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	117
5.1.1 Imobilização da proteína BSA	117
5.1.2 Imobilização do aminoácido lisina	122
5.1.3 Imobilização do peptídeo TAT.....	128
5.1.4 Imobilização do marcador 2-Abz.....	129
5.2 CONCLUSÕES PARCIAIS	131
<i>Capítulo VI</i>	132
RESULTADOS E DISCUSSÃO - LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	132

6.1 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	132
6.1.1 Validação do método analítico de quantificação por HPLC	132
6.1.2 Avaliação da liberação do fármaco	136
6.2 CONCLUSÕES PARCIAIS	140
<i>Capítulo VII</i>	141
RESULTADOS E DISCUSSÃO - LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	141
7.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PERMEAÇÃO NA BHE <i>in vivo</i>	141
7.1.1 Detecção por espectrofotômetro de fluorescência	141
7.1.2 Detecção por microscopia.....	154
7.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DIFUSÃO <i>in vitro</i>	155
7.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	158
<i>Capítulo VIII</i>	159
CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
8.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
8.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	161
<i>Capítulo IX</i>	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
APÊNDICE A.....	179
APÊNDICE B.....	181
APÊNDICE C.....	183
APÊNDICE D.....	196
APÊNDICE E.....	200
APÊNDICE F	205
APÊNDICE G.....	209
APÊNDICE H.....	213
APÊNDICE I	214
APÊNDICE J	217

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação dos perfis característicos de liberação de fármacos.	6
Figura 2.2: Principais mecanismos de controle da liberação de fármacos.	7
Figura 2.3: Representação da BHE.	10
Figura 2.4: Principais mecanismos de transporte através da BHE.	13
Figura 2.5: Esquema de uma nanopartícula polimérica funcionalizada.	14
Figura 2.6: Sequência de aminoácidos do peptídeo TAT.	16
Figura 2.7: Estrutura química do PMMA.	22
Figura 2.8: Estruturas químicas do PAA e do PMAA.	23
Figura 2.9: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas, sendo que o fármaco se encontra: a) dissolvido no núcleo; b) adsorvido à parede; c) retido na matriz; d) adsorvido ou disperso na matriz da nanopartícula polimérica.	26
Figura 2.10: Representação esquemática da polimerização em emulsão.	28
Figura 2.11: Representação esquemática da polimerização em miniemulsão.	29
Figura 2.12: Representação das interações entre a partícula e a célula.	33
Figura 2.13: Ilustração esquemática da rota química de adsorção utilizando EDC.	35
Figura 2.14: Estrutura química da rivastigmina.	38
Figura 2.15: Estrutura química do clioquinol.	38
Figura 2.16: Esquema ilustrativo da distribuição do fluxo sanguíneo na circulação e valores da porcentagem relativa em cada órgão.	44
Figura 3.1: Esquema do mini-reator de polimerização utilizado nos experimentos.	55
Figura 3.2: Representação das técnicas para determinação da eficiência de encapsulamento do fármaco.	65
Figura 3.3: Esquema do procedimento experimental adotado para imobilização da biomolécula.	67
Figura 3.4: Estrutura química do marcador de fluorescência 2-amino benzamida.	68
Figura 3.5: Montagens experimentais para testes de liberação.	69
Figura 3.6: Vias de administração da preparação contendo as nanopartículas nos camundongos.	74
Figura 3.7: Procedimento para preparo das amostras para análise por fluorescência.	75
Figura 3.8: Procedimento usado para preparo das amostras para análise por microscopia.	76

Figura 3.9: Sistema de cultivo transwell, modelo de cultivo simples para avaliação de passagem de fármacos por barreira celular.	77
Figura 4.1: Comparação visual do aspecto da emulsão, após agitação magnética (A) e após dispersão em ultrassom (B).	79
Figura 4.2: Amostras obtidas nos testes 5 e 6, respectivamente.	81
Figura 4.3: Fotografia da (A) Interface O/A formada e (B) emulsão inicial.	84
Figura 4.4: Distribuição de tamanho de partícula para as amostras finais de copolímero e de PMMA, conforme reações descritas na Tabela 4.3.	86
Figura 4.5: Curvas de conversão das reações descritas na Tabela 4.3.	87
Figura 4.6: Distribuição de massas molares para PMMA R06, copolímero R07 e R13.	88
Figura 4.7: Imagens de MEV das nanopartículas de P(MMA-co-AA) produzidas com iniciador KPS (R07) em diferentes magnitudes.	90
Figura 4.8: Termograma de DSC para amostra de PMMA (R01) e P(MMA-co-AA) R(04).	92
Figura 4.9: Termogramas de TGA obtidos para algumas amostras produzidas.	92
Figura 4.10: Medidas de ângulo de contato para amostras de PMMA (R01) e P(MMA-co-AA) (R04) e P(MMA-co-MAA) (R13).	93
Figura 4.11: Estrutura química dos copolímeros P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA).	94
Figura 4.12: Espectros de ¹ H-RMN das amostras de PMMA (R01), P(MMA-co-AA) (R04) e P(MMA-co-MAA) (R13).	95
Figura 4.13: Termograma de TGA do fármaco clioquinol.	97
Figura 4.14: Avaliação da solubilidade do clioquinol com o aumento da temperatura.	98
Figura 4.15: Aspecto dos polímeros obtidos por polimerização em massa.	99
Figura 4.16: Aspecto das reações em miniemulsão com a adição de diferentes concentrações de CQ, sendo (a) amostra com coloração escura e presença de aglomerados, (b) amostra com grandes aglomerados e (c) amostra com coloração escura e separação de fase.	100
Figura 4.17: Amostras para medidas de tensão interfacial. Formação de precipitado em temperatura ambiente para amostras com concentração de 2 a 5% (m/m).	101
Figura 4.18: Tensão interfacial ao longo do tempo, sendo (A) medidas realizadas em temperatura ambiente e com fase aquosa contendo ou não surfactante; e (B) medidas tomadas na temperatura de 70 °C para amostras com surfactante e clioquinol nas concentrações de 1 a 5% (m/m).	102
Figura 4.19: Espectros de H-RMN do clioquinol, e P(MMA-co-AA) CQ produzidas em massa.	104

Figura 4.20: Aspecto visual do sistema formado com o fármaco clioquinol, sendo (A) a solubilização do fármaco no monômero, (B) a interface O/A e (C) a pré-emulsão obtida após agitação magnética.	106
Figura 4.21: Distribuição de tamanhos para as amostras contendo o fármaco.	108
Figura 4.22: Curvas de conversão para as reações contendo o fármaco.	109
Figura 4.23: Distribuições de massas molares para P(MMA-co-AA) dopado com clioquinol, da reação R10.	110
Figura 4.24: Imagens de MET das nanopartículas de P(MMA-co-AA) (R10).	111
Figura 4.25: Termogramas de TGA obtidos para as amostras.	112
Figura 4.26: Termograma de DSC para avaliação da encapsulamento do fármaco clioquinol.	113
Figura 4.27: Espectro de H-RMN de P(MMA-co-AA) CQ produzido em miniemulsão.	114
Figura 5.1: Espectro de FTIR da proteína BSA.	120
Figura 5.2: Espectros de FTIR da amostra (R07) para o ensaio de imobilização da BSA.	121
Figura 5.3: Espectro de FTIR do aminoácido lisina.	124
Figura 5.4: Espectro de FTIR das nanopartículas (R07) após o ensaio de imobilização com lisina.	125
Figura 5.5: Espectro de H-RMN do aminoácido lisina e das nanopartículas (R07) antes e após a funcionalização.	126
Figura 5.6: Espectro de FTIR das nanopartículas (R07) após lavagens com diferentes soluções.	127
Figura 5.7: Espectro de FTIR das partículas de P(MMA-co-MAA) (R13) antes e após funcionalização.	128
Figura 5.8: Espectro de FTIR das nanopartículas (R10) após o ensaio de imobilização do TAT.	129
Figura 5.9: Espectro de FTIR para nanopartícula funcionalizada com o marcador de fluorescência 2-Abz.	130
Figura 6.1: Cromatogramas de HPLC para CQ e P(MMA-co-AA) em ACN.	133
Figura 6.2: Curva analítica para verificação da linearidade do método cromatográfico.	134
Figura 6.3: Concentração de saturação do clioquinol em solução de PBS (pH = 7,4) contendo diferentes concentrações de SDS.	137
Figura 6.4: Perfil de liberação do fármaco clioquinol a partir das nanopartículas de P(MMA-co-AA) e modelo de Peppas ajustado.	138

Figura 6.5: Perfil de liberação do fármaco clioquinol a partir das nanopartículas de P(MMA-co-MAA).....	139
Figura 7.1: Perfis de fluorescência para definição da técnica – Nanopartículas funcionalizadas adicionada diretamente ao cérebro.	142
Figura 7.2: Perfis de fluorescência para injeção IC das nanopartículas funcionalizadas no intervalo de circulação de 2 horas.....	143
Figura 7.3: Perfis de fluorescência após injeção IP das nanopartículas funcionalizadas com o peptídeo TAT e sem funcionalização no intervalo de circulação de 1 hora.....	144
Figura 7.4: Perfis de fluorescência das partículas no cérebro dos animais após injeção IP de amostras funcionalizadas com o peptídeo TAT e sem funcionalização para tempos de circulação de 2, 4 e 6 h.	145
Figura 7.5: Perfis de fluorescência nos órgãos estudados após injeção IP e EV da preparação NP-2Abz e NP-TAT-2Abz.	147
Figura 7.6: Dinâmica das nanopartículas no sangue do animal a partir das análises de fluorescência das amostras coletadas em tempos de circulação determinados.....	148
Figura 7.7: Dinâmica das nanopartículas no sangue corrigida e comparação da quantidade de material presente no sangue em cada tempo utilizando-se a área normalizada abaixo de cada curva.....	149
Figura 7.8: Perfis de fluorescência para injeções das preparações NP-TAT-2Abz e NP-2Abz (ambas P(MMA-co-AA) com tempos de circulação de 10 min e 30 min.....	151
Figura 7.9: Comparação das quantidades de nanopartículas de P(MMA-co-AA) encontradas em cada órgão normalizada pela máxima intensidade de fluorescência.	152
Figura 7.10: Perfis de fluorescência para injeções de partículas de P(MMA-co-MAA) com tempos de circulação de 10 min e 30 min.	153
Figura 7.11: Comparação da quantidade de nanopartícula de P(MMA-co-MAA) encontrada em cada órgão normalizada pela máxima intensidade de fluorescência.	154
Figura 7.12: Imagens de microscopia dos cortes histológicos dos cérebros.	155
Figura 7.13: Curvas de inibição celular.	156
Figura 7.14: Permeabilidade celular a partir da intensidade de fluorescência para as alíquotas retiradas dos compartimentos inferior e superior do suporte <i>Transwell</i> após 4 horas de incubação.	157
Figura C.1: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 1).....	183
Figura C.2: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 2).....	183
Figura C.3: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 3).....	184

Figura C.4: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 4).....	184
Figura C.5: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 5).....	185
Figura C.6: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 6).....	185
Figura C.7: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 7).....	186
Figura C.8: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 8).....	186
Figura C.9: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 9).....	187
Figura C.10: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 10).....	187
Figura C.11: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 11).....	188
Figura C.12: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 12).....	188
Figura C.13: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 13).....	189
Figura C.14: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 14).....	189
Figura C.15: Distribuições de tamanhos de partícula para PMMA (R01), durante a reação.	190
Figura C.16: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) (R08), durante a reação.....	191
Figura C.17: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) CQ (R011), durante a reação.....	191
Figura C.18: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-MAA) (R013), durante a reação.....	192
Figura C.19: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-MAA) (R014), durante a reação.....	192
Figura C.20: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-MAA) (R015), durante a reação.....	193
Figura C.21: Distribuições de tamanhos de partícula para PMMA (R01 e R02).	194
Figura C.22: Distribuições de tamanhos de partícula para PMMA (R01 e R06).	194
Figura C.23: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) (R04 e R05).	195
Figura C.24: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) (R03 e R04).	195
Figura D.1: Ajuste do modelo para o diâmetro de partículas.....	198
Figura D.2: Ajuste do modelo para o potencial zeta.....	199
Figura E.1: Curvas de distribuição de massas molares para P(MMA-co-AA) – reações R08 E R09.	200
Figura E.2: Curvas de distribuição de massas molares para P(MMA-co-AA) dopado com clioquinol – reações R11 e R12.....	200

Figura E.3: Curvas de distribuição de massas molares para P(MMA-co-MAA) – reações R14 e R15.	201
Figura E.4: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador PBO a 1 % (m/m).	202
Figura E.5: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador PBO a 2 % (m/m).	202
Figura E.6: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador AIBN a 0,5 % (m/m).	203
Figura E.7: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador AIBN a 1 % (m/m).	203
Figura E.8: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador PBO a 2 % (m/m).	204
Figura F.1: Termograma de DSC para PMMA (R01).	205
Figura F.2: Termograma de DSC para P(MMA-co-AA) (R04).	205
Figura F.3: Termograma de DSC para P(MMA-co-AA) (R05).	206
Figura F.4: Termograma de DSC para P(MMA-co-AA) CQ (R10).	206
Figura F.5: Termograma de DSC para P(MMA-co-MAA) (R13).	207
Figura G.1: Espectro de C-RMN da amostra de PMMA (R01); produzida com iniciador KPS.	209
Figura G.2: Espectro de C-RMN da amostra de P(MMA-co-AA) (R04); produzida com 15% de comonômero e iniciador KPS.	209
Figura G.3: Espectro de H-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R03); produzida com 7% de comonômero.	210
Figura G.4: Espectro de C-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R03); produzida com 7% de comonômero.	210
Figura G.5: Espectro de H-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R05); produzida com 15% de comonômero e iniciador PBO.	211
Figura G.6: Espectro de C-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R05); produzida com 15% de comonômero e iniciador PBO.	211
Figura G.7: Espectro de C-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R07) com lisina imobilizada.	212
Figura I.1: Espectro de varredura de uma solução 0,1 g/L de clioquinol em solução aquosa contendo surfactante ($\lambda_{\text{máx}} = 256 \text{ nm}$).	214

Figura I.2: Curva de calibração para solução de clioquinol em água contendo surfactante.....	215
Figura I.3: Espectro de varredura de uma solução 0,1 g/L de clioquinol em etanol ($\lambda_{\text{máx}} = 256 \text{ nm}$).....	215
Figura I.4: Curva de calibração para solução de clioquinol em etanol.	216

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Algumas propriedades do clioquinol.	39
Tabela 2.2: Principais modelos de liberação.	43
Tabela 2.3: Produtos baseados em nanopartículas e usados para terapia venosa no tratamento do câncer.	46
Tabela 3.1: Receita experimental das reações de polimerização para as diferentes condições avaliadas.	57
Tabela 3.2: Condições usadas para o método cromatográfico utilizado para quantificação do clioquinol.	71
Tabela 4.1: Resultados do planejamento experimental após a polimerização.	80
Tabela 4.2: Resultados de tamanho médio, PDI e potencial zeta para as nanopartículas produzidas com 1% de SDS.	84
Tabela 4.3: Resultados de tamanho, PDI e potencial zeta para as nanopartículas. ...	86
Tabela 4.4: Massas molares médias (Mw) e índice de polidispersão (IP) de amostras obtidas ao final da reação.	89
Tabela 4.5: Resultados de conversão para os ensaios de polimerização em massa..	98
Tabela 4.6: Massa molares médias (Mw) e índice de polidispersão (IP) para amostras produzidas por polimerização em massa.	105
Tabela 4.7: Resultados de tamanho, PDI e potencial zeta para as nanopartículas produzidas na presença do clioquinol.	107
Tabela 4.8: Resultados análises térmicas.	112
Tabela 4.9: Eficiências de encapsulamento.	115
Tabela 5.1: Quantificação de BSA imobilizada nas nanopartículas.	118
Tabela 5.2: Comparação do potencial zeta das nanopartículas antes e após a funcionalização.	119
Tabela 5.3: Principais bandas de FTIR associadas ao sistema estudado.	120
Tabela 5.4: Quantificação de lisina imobilizada nas nanopartículas.	123
Tabela 5.5: Quantificação do peptídeo TAT imobilizado nas nanopartículas.	129
Tabela 6.1: Desvios padrão relativos para avaliação da precisão nos ensaios de calibração de HPLC.	134

Tabela 6.2: Porcentagem de recuperação do clioquinol para avaliação da exatidão dos ensaios de HPLC.....	135
Tabela 6.3: Parâmetros de validação do método de HPLC proposto para quantificação do clioquinol.....	136
Tabela 6.4: Modelos cinéticos de liberação e coeficiente de correlação.....	139
Tabela 7.1: Cálculo da razão m/m de distribuição de 2-Abz e TAT.	146
Tabela 7.2: CC50 calculada a partir dos resultados de viabilidade celular.	156
Tabela A.1: Avaliação da possibilidade de formação de micela para as condições de teste.....	180
Tabela B.1: Sequência de diluição para montagem da curva de calibração.....	181
Tabela B.2: Sequência de diluição para montagem da curva de calibração.....	182
Tabela D.1: Matriz de correlação dos parâmetros mostrados na Equação D.3.	197
Tabela D.2: Matriz de correlação dos parâmetros mostrados na Equação D.4.	198
Tabela F.1: Cálculo da porcentagem de comonômero incorporada de acordo com a Equação de FOX (1956).	208
Tabela H.1: Cálculo da porcentagem de comonômero incorporado de acordo com as razões de reatividade.....	213
Tabela J.1: Cálculo da quantidade mínima de proteína BSA para formação de uma monocamada.....	217

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-Abz	2-amino benzamida
AA	Ácido acrílico
ACN	Acetonitrila
AIBN	Azobisisobutironitrila
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de soro bovino
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CQ	Clioquinol
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSC	Calorimetria diferencial de verredura
EDC	1-etil-3-(dimetil aminopropil) carbodiimida
ENGEPOL	Laboratório de Engenharia de Polímeros
EV	Endovenoso
EVA	Poli(etileno-co-acetato de vinila)
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
GRIFT	Laboratório de Fenômenos Interfaciais
IC	Intracraniano
IP	Intraperitoneal
KPS	Persulfato de potássio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LABNANO	Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LYS	Lisina

MAA	Ácido metacrílico
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de Tetrazolium 3-4,5 dimetiliazol-2,5 difenil tetrazolium
NHS	N-hidroxi succinimida
O/A	Orgânica / aquosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA	o-ftaldialdeído
PAA	Poli(ácido acrílico)
PAM	Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros
PBCA	Poli(cianoacrilato de butila)
PBO	Peróxido de benzoíla
PBS	Tampão fosfato salino
PDI	Índice de polidispersão
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLC	Policaprolactona
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
P(MMA-co-AA)	Poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)
P(MMA-co-MAA)	Poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TAT	<i>Trans-activating trasncriptor</i>
Tg	Temperatura de transição vítrea
THF	Tetrahidrofurano
TGA	Termogravimetria
UV-VIS	Ultravioleta - visível

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

Sistemas de liberação de fármacos têm sido alvos de intensas pesquisas nos últimos anos, sendo que o desenvolvimento de materiais poliméricos contribuiu para o progresso de diversas tecnologias nesta área. Estes sistemas permitem a absorção e liberação da substância ativa de maneira controlada, evitando aplicação de doses em concentrações muito elevadas, além de permitir o direcionamento do fármaco à sítios específicos (KIM *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2012; PARK, 2014). A utilização de nanopartículas poliméricas como veículo para disponibilização de fármacos surgiu como uma alternativa para o tratamento de diversas doenças, como câncer, doenças oculares e distúrbios neurológicos, tendo sido bastante explorada nos últimos anos (PATEL *et al.*, 2012; KREUTER, 2014).

Uma grande variedade de materiais poliméricos pode ser utilizada em aplicações biomédicas, desde que apresente características desejadas de biocompatibilidade e versatilidade estrutural. Particularmente, o poli(metacrilato de metila) (PMMA) é um polímero bastante conhecido e estudado como modelo para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos a partir de nanopartículas. A composição e o tamanho das partículas podem ser manipulados de modo a obter produtos com propriedades específicas para a aplicação (MENDES *et al.*, 2012). Dentre as possíveis aplicações dessas nanopartículas, a utilização no tratamento de doenças que acometem o sistema nervoso central é bastante promissora.

O sistema nervoso central é uma estrutura complexa e sensível, que se encontra vulnerável a doenças capazes de afetar o mecanismo molecular das transformações que ocorrem nas células nervosas. Dentre as desordens neurológicas, a incidência de doenças neurodegenerativas, caracterizadas pela perda progressiva de neurônios, tem aumentado bastante na população. Estas doenças normalmente levam à perda de funções motoras, fisiológicas e cognitivas do paciente (MALHOTRA e PRAKASH, 2011).

No que tange ao tratamento destas doenças, um grande desafio que se impõe a vários tipos de terapias consiste em atravessar a barreira hematoencefálica, uma

membrana de proteção do cérebro, possibilitando a disponibilização de fármacos diretamente no cérebro (KREUTER, 2014). A literatura relata que a maioria dos agentes terapêuticos administrados de forma sistêmica não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a intermediação de receptores. Dessa forma, o estudo de superfícies funcionalizadas capazes de interagir com os receptores da membrana hematoencefálica pode possibilitar a passagem de nanopartículas carregadas com medicamentos para o cérebro, aumentando a eficácia do tratamento (MAHOTRA e PRAKASH, 2011).

Dessa forma, o tema central dessa pesquisa foi o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para o encapsulamento e transporte de fármacos, com capacidade de interação com receptores da membrana hematoencefálica, por meio da imobilização de biomoléculas na superfície das partículas.

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios de Engenharia de Polímeros (EngePol) e Fenômenos Interfaciais (GRIFIT), ambos do Programa de Engenharia Química. Para a realização dos ensaios *in vivo*, buscaram-se parcerias com professores da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Os ensaios *in vitro* foram realizados com conjunto com pesquisadores da Fiocruz/RJ. Os grupos têm experiência acumulada nas áreas de polímeros para aplicações biomédicas e de fenômenos interfaciais, com diversas teses já defendidas e artigos publicados. Citam-se como exemplos os trabalhos de LORCA *et al.* (2012) e PAIVA *et al.* (2016), que estudaram a síntese de partículas por polimerização em miniemulsão para o encapsulamento de filtros solares; FONSECA *et al.* (2013), que trabalharam com o encapsulamento de praziquantel em partículas produzidas via miniemulsão; a produção de nanopartículas por polimerização RAFT em miniemulsão, que foi estudada por OLIVEIRA *et al.* (2013), MOREIRA *et al.* (2014) e WAY (2017); PEIXOTO (2013), que explorou a copolimerização para a produção de nanopartículas poliméricas com diferentes grupos funcionais para a imobilização de proteínas por adsorção; MOREIRA (2015), que também estudou a imobilização química de proteína em nanopartículas poliméricas; PINTO *et al.* (2014), que desenvolveram suportes poliméricos para catalisadores enzimáticos; e NICOLINI (2013) e MACHADO (2015), que estudaram a imobilização de enzimas em nanotubos via reação química.

1.2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um sistema para encapsulamento e transporte sítio-dirigido de fármacos, baseado em nanopartículas

poliméricas produzidas pela técnica de polimerização em miniemulsão, para aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Como objetivos específicos, citam-se:

- Avaliar o efeito do surfactante na produção de nanopartículas via polimerização em miniemulsão, utilizando ferramentas de planejamento de experimentos;
- Investigar a encapsulamento de um fármaco modelo para entrega no sistema nervoso central;
- Avaliar o efeito da composição superficial das nanopartículas sobre a eficiência de funcionalização, usando polímeros à base de metacrilato de metila e de seu copolímero com ácido acrílico e ácido metacrílico;
- Estudar a adsorção específica de ligantes às nanopartículas por meio de rotas química e física, a fim de desenvolver um sistema capaz de atravessar a barreira hematoencefálica;
- Avaliar a capacidade das nanopartículas para atravessar a barreira hematoencefálica por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco encapsulado.

1.3 APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Esta tese de doutorado foi dividida em cinco capítulos e organizada de acordo com a cronologia de realização dos experimentos, seguindo uma ordem lógica de pesquisa.

Após esta breve introdução, faz-se no Capítulo II uma revisão da literatura, de modo a contextualizar e justificar o trabalho proposto. A revisão é baseada na apresentação de alguns dos principais estudos desenvolvidos na área de sistemas poliméricos para liberação de fármacos, em especial relacionados à produção de nanopartículas para o transporte de ativos através da barreira hematoencefálica. Dessa forma, faz-se uma breve descrição a respeito da membrana hematoencefálica e sobre o direcionamento de fármacos para o sistema nervoso central. Apresentam-se, neste capítulo, as principais doenças neurodegenerativas e os métodos aplicáveis para o tratamento. O capítulo descreve ainda os polímeros normalmente utilizados na área biomédica e as técnicas empregadas para a produção das nanopartículas. A funcionalização das nanopartículas por meio de imobilização de biomoléculas é também

explorada, a fim de permitir a liberação sítio-dirigida do fármaco. Descrevem-se os principais tipos de ensaios de liberação de fármacos disponíveis para avaliação *in vitro* e os modelos de liberação para previsão da cinética de liberação. Ao final do capítulo, discute-se o tema da toxicidade de sistemas nanoparticulados e de viabilidade celular, além de serem apresentados produtos baseados em nanopartículas disponíveis no mercado e em fase de testes.

O Capítulo III se inicia com a descrição da metodologia experimental adotada para realização das reações de polimerização, dos ensaios de funcionalização e das análises de caracterização dos materiais obtidos. Dentre as técnicas de caracterização, citam-se medidas de distribuição de tamanhos de partícula e de potencial zeta, avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), medidas de ângulo de contato, análises térmicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de termogravimetria (TGA), avaliação da conversão e massas molares, além da eficiência de encapsulamento. Apresentam-se ainda o desenvolvimento e a validação do método analítico para quantificação do fármaco, bem como a metodologia usada para conduzir os testes de liberação *in vitro*. A metodologia utilizada para avaliação da capacidade do sistema desenvolvido em permear a barreira hematoencefálica é também discutida neste capítulo.

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho são apresentados nos capítulos seguintes. No capítulo IV são apresentados os resultados relacionados às reações de polimerização e encapsulamento do fármaco. Os resultados dos ensaios de funcionalização são descritos e discutidos no capítulo V. No capítulo VI apresentam-se os resultados relacionados aos testes de liberação conduzidos. Os resultados sobre a capacidade de transposição à barreira hematoencefálica, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* são mostrados no capítulo VII.

O Capítulo VIII apresenta as principais conclusões obtidas durante o desenvolvimento desta tese de doutorado, mostrando os principais avanços obtidos na área e as perspectivas e sugestões para continuação do trabalho.

O Capítulo IX traz as referências bibliográficas utilizadas para a construção do trabalho, sendo em seguida apresentados os APÊNDICES.

Capítulo II

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Entende-se por liberação o processo em que um princípio ativo presente em uma forma farmacêutica torna-se disponível para absorção pelo organismo. Assim, sistema ou dispositivo de liberação são termos que definem a forma ou o mecanismo pelo qual o princípio ativo é disponibilizado no organismo, após sua administração (BASSYOUNI *et al.*, 2013). Com o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias, os sistemas de liberação podem ser utilizados não somente para a disponibilização de pequenas moléculas farmacêuticas no organismo, mas também para outros fatores terapêuticos, como proteínas e genes (WANG e VON RECUM, 2011). A maioria dos sistemas de liberação estudados é baseada em materiais poliméricos, devido ao caráter versátil e facilmente manipulável desses materiais, capazes de se adaptarem às necessidades específicas dos sistemas de interesse (WANG e VON RECUM, 2011; TIAN *et al.*, 2012).

Podem-se dividir os sistemas de liberação de fármacos em dois grupos: tradicionais e modificados. Nos sistemas de liberação tradicionais, a concentração do fármaco atinge um pico logo após a administração, declinando em seguida. Os níveis de concentração do fármaco são dependentes das doses administradas e cada fármaco está associado a uma faixa de ação terapêutica, acima da qual o fármaco é tóxico e abaixo da qual o fármaco é ineficaz. Além disso, ressalta-se a baixa solubilidade de moléculas hidrofóbicas nos fluidos corporais e a alta toxicidade de alguns medicamentos, problemas que podem ser minimizados com a formulação de dispositivos de liberação. Na liberação modificada, busca-se o desenvolvimento de um sistema capaz de manter a concentração do medicamento na corrente sanguínea dentro da faixa terapêutica desejada (KIM *et al.*, 2009; BASSYOUNI *et al.*, 2013; PARK, 2014). Estes perfis característicos de liberação são apresentados na Figura 2.1.

No caso da liberação modificada, os sistemas transportadores de fármacos podem ser capazes de compartimentar a substância ativa e direcioná-la para os sítios (espaço) onde deve exercer o efeito farmacológico, controlando a velocidade de

liberação (tempo) sem alterar a estrutura química da molécula transportada (KIM *et al.*, 2009).

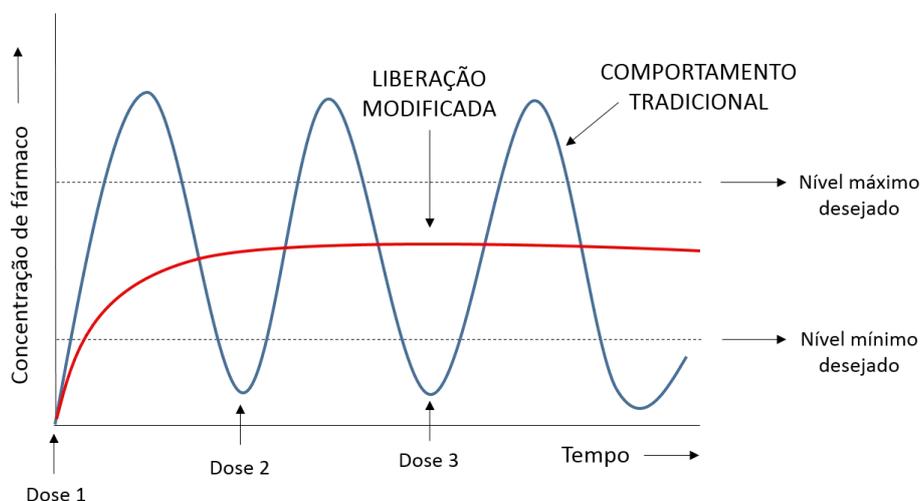


Figura 2.1: Representação dos perfis característicos de liberação de fármacos.

2.1.1 Liberação modificada de fármacos

O termo liberação modificada é usado para descrever os sistemas cujas características de liberação do fármaco são selecionadas com fins terapêuticos ou para maior conveniência do paciente, não oferecidos pelas formas tradicionais. Dentre as diferentes condições de liberação modificada em relação ao tempo, a disponibilização do fármaco pode ocorrer de forma estendida, retardada ou controlada (PARK, 2014).

A liberação estendida tem como objetivo manter o processo de liberação do fármaco por um período maior de tempo. Os termos liberação prolongada, liberação sustentada e liberação repetida são utilizados para descrever sistemas com este padrão (NATARAJAN, 2014). Na forma retardada, o início da absorção do princípio ativo ocorre após um determinado período de tempo, após o qual a liberação é praticamente imediata (MANADAS *et al.*, 2002). Já o termo liberação controlada descreve a liberação do princípio ativo baseada em um padrão cinético pré-determinado, de modo que o fármaco é liberado com taxas semelhantes em cada intervalo de tempo (WEISER e SALTZMAN, 2014).

O termo liberação modificada é também utilizado para os sistemas sítio-específicos, em que se tem o direcionamento do princípio ativo. Estes tipos de veículos necessitam modificações nas propriedades superficiais que garantam a interação com as células (MALHOTRA *et al.*, 2013).

Os sistemas de liberação modificada permitem o monitoramento tanto da massa quanto da taxa com a qual o fármaco é distribuído, proporcionando benefícios terapêuticos significantes, como disponibilização em concentrações elevadas diretamente no local de ação e por um longo período de tempo, minimizando efeitos colaterais e problemas de sobredosagem e subdosagem (MANADAS *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2009).

O mecanismo de liberação do fármaco em dispositivos de liberação normalmente é controlado pela difusão, grau de inchamento, erosão ou estímulos externos, como pH, temperatura e presença de biomoléculas (WANG e VON RECUM, 2011).

Nos sistemas controlados pela difusão, o fármaco é liberado com base em um gradiente de concentração. Estes sistemas são normalmente baseados na Lei de Fick da difusão, embora alterações da composição do material e da geometria do dispositivo possam resultar em perfis de liberação não lineares. Já nos sistemas controlados pelo inchamento, o aumento da flexibilidade do polímero após a absorção de fluidos produz maiores volumes livres, o que melhora a mobilidade das moléculas do fármaco e a difusão. O processo de erosão normalmente é associado aos materiais biodegradáveis, sendo a liberação controlada por mecanismos físicos de transporte de massa e por reações químicas de degradação. Finalmente, nos sistemas controlados por estímulos, a liberação ocorre somente após a ativação do material (WANG e VON RECUM, 2011). A Figura 2.2 apresenta um resumo dos principais mecanismos de controle da liberação de ativos.

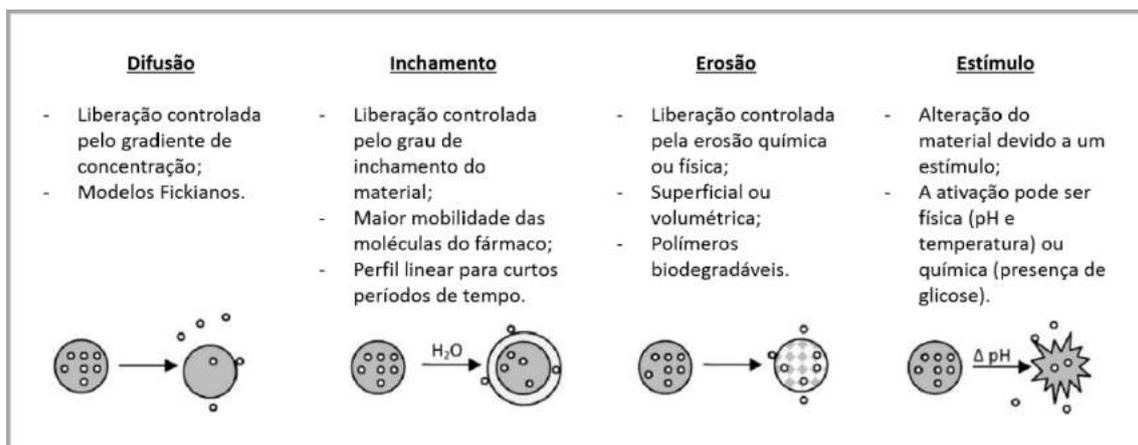


Figura 2.2: Principais mecanismos de controle da liberação de fármacos.

Adaptada de WANG e VON RECUM (2011).

2.2 DIRECIONAMENTO DE FÁRMACOS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sucesso do tratamento de doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC) está atrelado à capacidade de disponibilização específica dos medicamentos. Os fármacos dirigidos ao SNC precisam atravessar as barreiras de proteção do cérebro, formadas pela barreira hematoencefálica (BHE) e pelo líquido cefalorraquidiano (LCR) (WONG *et al.*, 2012). A BHE permite a passagem seletiva de moléculas essenciais por meio de receptores (RONEY *et al.*, 2005; BANKS, 2012; BEGLEY, 2014). O desenvolvimento de sistemas capazes de atravessar as membranas de proteção constitui um desafio para os pesquisadores.

KIM *et al.* (2009) descreveram duas principais rotas para o direcionamento de fármacos no organismo. A primeira refere-se à sinalização passiva, em que as partículas que contêm o agente terapêutico circulam pela corrente sanguínea e são acumuladas em regiões tumorais devido ao aumento localizado da permeabilidade dos vasos sanguíneos, cujo efeito é denominado de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR). Neste caso, normalmente são utilizados sistemas conjugados com poli(etileno glicol) para aumentar o tempo de circulação e a biodisponibilidade. Na segunda estratégia, denominada sinalização ativa, são utilizados ligantes específicos, como proteínas, peptídeos e anticorpos, capazes de serem reconhecidos por células do organismo. A utilização de sistemas cujas superfícies foram projetadas para melhorar a ligação seletiva com receptores específicos apresenta vantagens em termos de acumulação nos sítios alvo, diminuindo a exposição de células sadias ao fármaco (MALHOTRA e PRAKASH, 2011; ELSABAHY e WOOLEY, 2012).

Nos últimos anos tem sido observado progresso significativo no campo da nanotecnologia para o desenvolvimento de possíveis sistemas carreadores de fármacos para o SNC (TORCHILIN, 2008; PATEL *et al.*, 2012; CHEN e LIU, 2012). Estes sistemas geralmente são classificados nas seguintes categorias: lipossomas, nanopartículas poliméricas ou metálicas e dendrímeros (ELSABAHY e WOOLEY, 2012; KREUTER, 2014; MUSYANOVYCH e LANDFESTER, 2014). Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por bicamada lipídica em torno de um núcleo aquoso, capazes de armazenar substâncias hidrofílicas e lipofílicas. As nanopartículas são estruturas esféricas que podem ser produzidas a partir de diversos materiais. Já os dendrímeros são partículas construídas por meio do crescimento radial, de forma repetitiva, a partir de um núcleo funcionalizado, dando origem a estruturas muito pequenas, da ordem de 1-10 nm, ramificadas e com grande número de grupamentos funcionais na superfície, capazes de interagir com outras moléculas (MUSYANOVYCH e LANDFESTER, 2014). Dentre

estes, as nanopartículas poliméricas apresentam-se como candidatas promissoras para utilização em sistemas transportadores de fármacos para o SNC (RONEY *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2012; KREUTER, 2013; KREUTER, 2014). Além disso, a utilização de nanopartículas para atravessar a BHE pode permitir o diagnóstico precoce de doenças do SNC e também o controle da progressão das doenças (KANWAR *et al.*, 2012).

Os carreadores nanométricos apresentam usualmente alta especificidade e efeitos colaterais reduzidos. No entanto, existem poucos produtos desenvolvidos devido a problemas de solubilidade, instabilidade e baixa penetração no SNC (KREUTER, 2014).

2.2.1 A barreira hematoencefálica e o líquido cefalorraquidiano

Em 1885, Paul Ehrlich demonstrou experimentalmente que a injeção de um corante no sistema circulatório de mamíferos leva à coloração de todos os órgãos do corpo, exceto o cérebro e a medula espinal. Atribuiu-se a essa observação uma baixa afinidade do tecido nervoso para tal corante. Cerca de 30 anos mais tarde, Edwin Goldmann notou o fenômeno oposto por meio da injeção de azul de tripano diretamente no fluido cerebral. O corante manchou todo o sistema nervoso e nenhum dos órgãos periféricos, sugerindo a presença de uma barreira entre o sistema nervoso central (SNC) e a circulação (CARDOSO *et al.*, 2010).

A barreira hematoencefálica (BHE) é o mecanismo de defesa do cérebro contra a entrada de patógenos, como vírus, bactérias, parasitas e toxinas. A BHE atua também como uma membrana semipermeável, permitindo a disponibilização de nutrientes e o fluxo de íons, garantindo um ambiente adequado para o funcionamento do cérebro (RONEY *et al.*, 2005; KANWAR *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014).

Segundo BALLABH *et al.* (2004), pequenas moléculas lipofílicas, tais como O₂ e CO₂, podem difundir livremente através das membranas plasmáticas da BHE, de acordo com os gradientes de concentração. Nutrientes, incluindo glicose e aminoácidos, atravessam a membrana com o auxílio de transportadores, enquanto que a endocitose mediada por receptores garante a passagem de moléculas maiores, incluindo insulina, leptina e ferro transferrina.

Da mesma forma, devido à especificidade e natureza restritiva da BHE, somente moléculas lipofílicas com massa molar menor que 500 Da conseguem atravessá-la em quantidades farmacologicamente significativas. Porém a grande maioria dos possíveis fármacos não cumpre este requisito (PATEL *et al.*, 2012).

A BHE é composta por células endoteliais agrupadas e muito próximas (*Tight junctions*), garantindo a interface entre o cérebro e o sangue. Esta densidade celular aumentada restringe ainda mais a passagem de substâncias. As células endoteliais são compostas por uma combinação de proteínas trans-membrana e proteínas citoplasmáticas, formando um sistema de conexão célula-célula extremamente restritivo. As características estruturais dessas células endoteliais tornam a BHE uma membrana celular quase contínua (ZOU *et al.*, 2013).

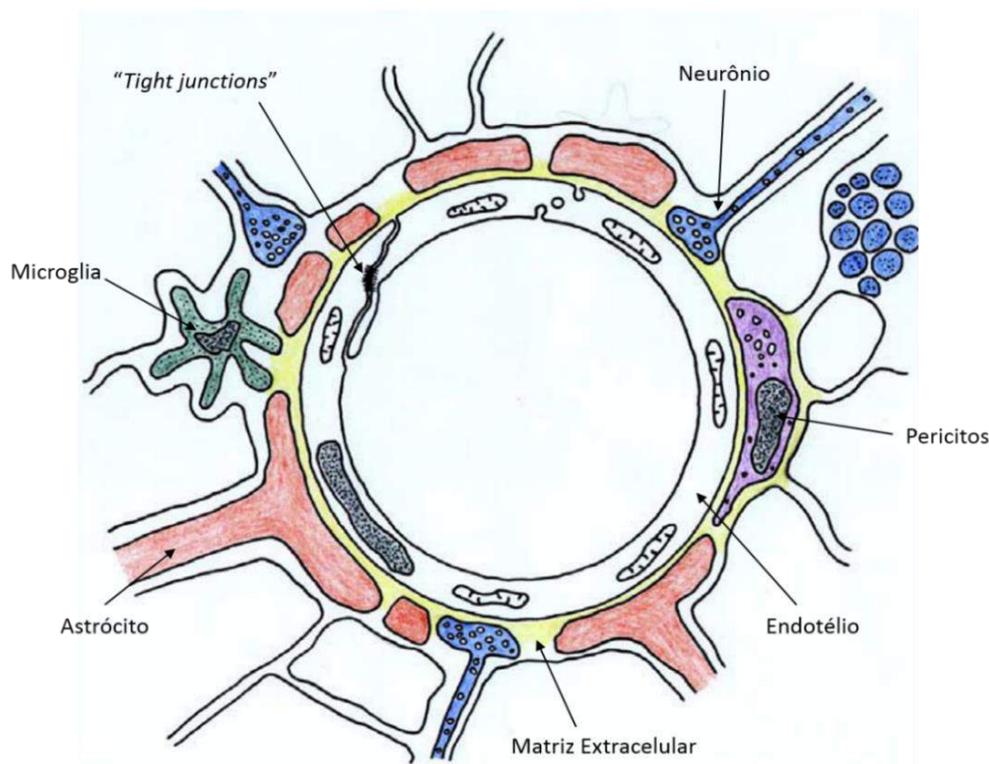


Figura 2.3: Representação da BHE.

Adaptada de BEGLEY (2004).

*Astrócitos: Células mais abundantes do SNC e responsáveis pela sustentação e nutrição dos neurônios, além do funcionamento e formação de sinapses.

**Microglia: Células que atuam na defesa imune do SNC.

***Pericitos: Células vasculares essenciais na manutenção das funções metabólicas, mecânicas e de sinalização. Estudos *in vivo* sugerem que as interações dos pericitos com as células endoteliais são importantes para regular a BHE, sendo que a ruptura dessas interações pode levar a disfunção e inflamação da BHE (ROJAS *et al.*, 2011).

As células endoteliais, juntamente com os astrócitos*, micróglia**, pericitos***, neurônios e matriz extracelular, formam esta unidade neurovascular, apresentada na Figura 2.3. Este sistema altamente coordenado regula dinamicamente a permeabilidade vascular e fornece uma base para a compreensão da fisiologia da BHE, incluindo os mecanismos por meio dos quais esta pode ser influenciada pela ação de fármacos e doenças (BICKER *et al.*, 2014).

Os astrócitos são células gliais que interagem com as células endoteliais, assegurando adequada função neuronal e controle do fluxo de sangue no cérebro (BICKER *et al.*, 2014). Os pericitos são essenciais para a formação e manutenção da BHE, uma vez que atuam na regulação da homeostase cerebral. Estudos mostram que a ruptura das interações entre os pericitos e as células endoteliais pode levar à disfunção e inflamação da BHE. A matriz extracelular representa cerca de 20% do volume total do cérebro e é responsável pelo ancoramento dos receptores endoteliais por meio de interações com proteínas. Alterações na estrutura da matriz extracelular podem afetar a permeabilidade da BHE (CARDOSO *et al.*, 2010).

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido incolor que preenche os ventrículos do cérebro e o espaço subaracnóideo (entre o crânio e o córtex cerebral), cuja função primordial é de proteção mecânica. O LCR também fornece um sistema de drenagem e remoção de produtos de metabolismo e moléculas do cérebro (WONG *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014).

A habilidade para atravessar a BHE está relacionada às características físicas e químicas da superfície das nanopartículas (COSTANTINO *et al.*, 2005). Com o objetivo de aumentar a eficiência de absorção pela BHE, certas modificações têm sido investigadas, incluindo a conjugação a ligantes específicos ou revestimento por surfactante (RAO *et al.*, 2008).

2.2.2 Mecanismos de transporte através da barreira hematoencefálica

Com o intuito de explicar as possíveis formas de atravessar a BHE por meio de sistemas nanoparticulados, KREUTER (2014) propôs a existência de oito mecanismos de transporte, sendo eles:

- 1) Aumento da retenção das nanopartículas nos capilares sanguíneos do cérebro, combinada à adsorção das nanopartículas pela parede dos

- capilares. Dessa forma, o transporte através da BHE pode ocorrer devido ao aumento do gradiente de concentração;
- 2) Utilização de polissorbato 80 (surfactante e emulsificante comercial Tween 80) como agente de revestimento, inibindo o sistema de efluxo, especialmente pela glicoproteína P;
 - 3) Efeito tóxico sobre a vasculatura cerebral, levando a inflamação e aumento de permeabilidade;
 - 4) Solubilização de lipídeos da membrana, levando à sua fluidização e maior permeabilidade dos fármacos pela BHE;
 - 5) Abertura das junções existentes entre as células da BHE, de maneira que o fármaco pode permear através destas junções de forma livre ou em conjunto com as nanopartículas;
 - 6) Endocitose pelas células (entrada de substâncias por englobamento pela membrana celular), seguida pela liberação do fármaco;
 - 7) Transcitose (tráfego de substâncias na célula em vesículas) através da camada de células da BHE;
 - 8) Combinação dos efeitos acima descritos.

Nos últimos anos pesquisas apontam que alguns destes mecanismos são ineficazes para atravessar a BHE. Assim, os mecanismos (1-5) são considerados pouco relevantes para elucidar o comportamento das partículas (KREUTER, 2014).

Conforme apresentado por KREUTER *et al.* (2003), a criação de gradientes de concentração do fármaco por aderência das nanopartículas na superfície dos capilares sanguíneos não é suficiente para garantir um transporte eficiente. A difusão do ativo depende também do sistema de efluxo* pela glicoproteína P**. Foi mostrado ainda que a injeção de nanopartículas revestidas com polissorbato 80 não permite o transporte desejado ao cérebro. Dessa forma, o sistema de efluxo não pode ser bloqueado pela presença de polissorbato, o que refuta os mecanismos 1 e 2.

*Sistema de efluxo: Transporte de moléculas e substâncias para fora da célula.

**Glicoproteína P: Proteína que atua como uma bomba de efluxo ativa (dependente de energia) que transporta fármacos para a parte externa das células do fígado, rins, cérebro e trato gastrointestinal, estando envolvida no processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos (AZEREDO *et al.*, 2009).

Da mesma forma, os mecanismos 3, 4 e 5 também podem ser questionados, como sugerido por OLIVIER *et al.* (1999) e CALVO *et al.* (2001). O primeiro trabalho indicou que o recobrimento de partículas com polissorbato 80 poderia induzir o aumento da permeabilidade da BHE devido a um efeito tóxico, facilitando o transporte. Porém, o segundo estudo mostrou que, ao aumentar o tempo de circulação das partículas no organismo, aumentava-se também a concentração no cérebro, sem perda de integridade da BHE.

Os resultados destes trabalhos mostraram aspectos importantes que devem ser levados em conta na concepção de sistemas de entrega de fármacos no SNC, como as propriedades específicas que o transportador deve apresentar para permitir a interação com as células endoteliais e circulação no organismo (CALVO *et al.*, 2001)

Assim, acredita-se que o mecanismo de transporte para o cérebro ocorra principalmente por endocitose das partículas por meio de receptores na BHE, seguido por transcitose pelas células (KREUTER, 2001; ABBOTT *et al.*, 2010; CHEN e LIU, 2012; WOHLFART *et al.*, 2012; KREUTER, 2014). A endocitose envolve a ligação da molécula vetor associada a um veículo de transporte do fármaco. Este sistema é reconhecido por ligantes específicos na membrana celular, formando os endossomas (vesículas contendo as substâncias a serem transportadas) (TORCHILIN, 2008). A Figura 2.4 apresenta os principais mecanismos de transporte através da BHE.

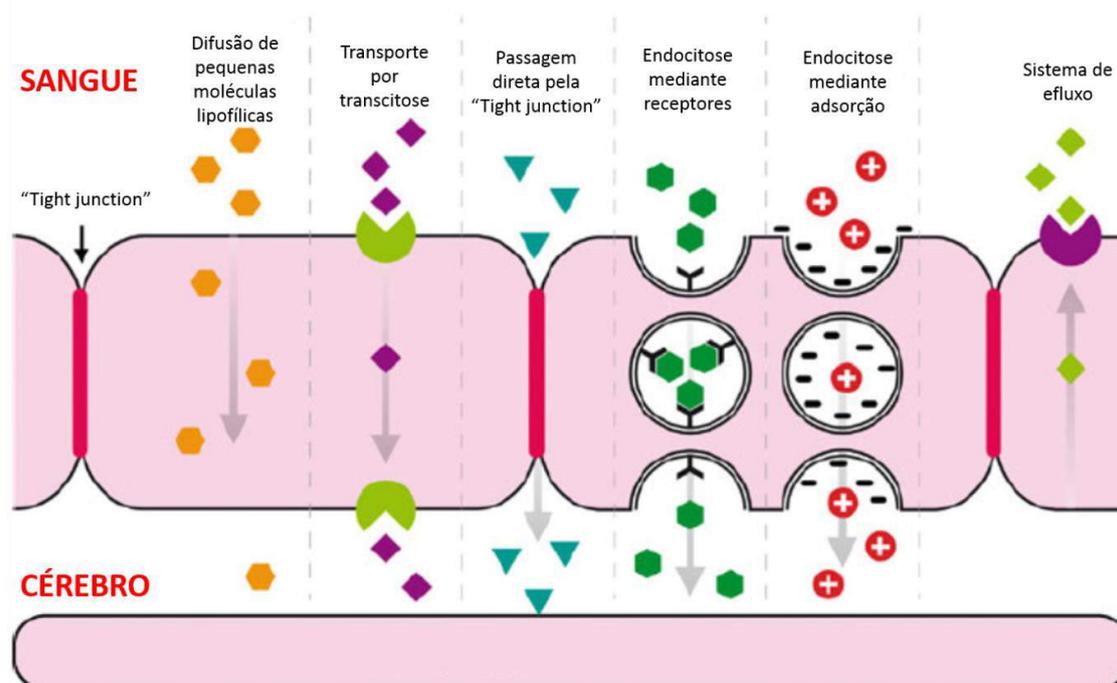


Figura 2.4: Principais mecanismos de transporte através da BHE.

Adaptada de ROOY *et al.* (2011).

Os estudos prévios indicam que, sem que se modifique a superfície, as nanopartículas poliméricas apresentam capacidade limitada para atravessar a BHE. Deste modo, para atingir os receptores, a superfície das nanopartículas pode ser funcionalizada pela inserção de proteínas ou peptídeos (PATEL *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012). A Figura 2.5 apresenta o esquema de uma nanopartícula polimérica funcionalizada e contendo um fármaco.

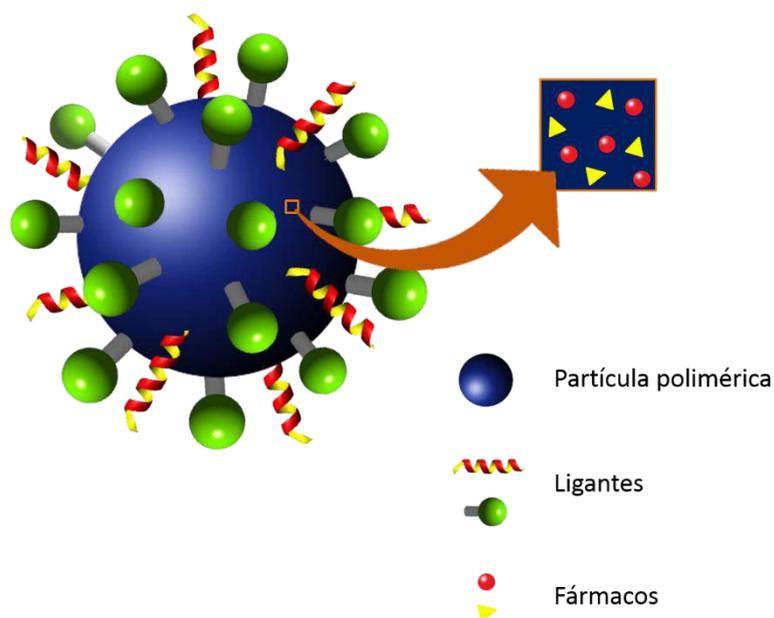


Figura 2.5: Esquema de uma nanopartícula polimérica funcionalizada.

Como possíveis ligantes para o transporte de fármacos através da BHE, recentes trabalhos mostram que o uso de apolipoproteínas adsorvidas sobre nanopartículas pode ser eficiente (KREUTER *et al.*, 2002; KREUTER *et al.*, 2007; ABBOTT *et al.*, 2010). As apolipoproteínas são proteínas que se ligam aos lipídios, sendo responsáveis pelo transporte de lipídeos através do sistema circulatório. Além disso, podem também atuar como cofatores de enzimas e ligantes de receptores (KREUTER, 2014).

Experimentos realizados por KREUTER *et al.* (2002), em que partículas de poli(cianoacrilato de butila) (PBCA) recobertas com polissorbato 80 foram avaliadas, mostraram que as apolipoproteínas E e B (apo E e apo B) foram capazes de interagir com receptores na BHE. Os resultados deste estudo sugeriram ainda que as moléculas de polissorbato 80 funcionaram como âncora para as apolipoproteínas. Outro trabalho de KREUTER *et al.* (2007) mostrou que as apolipoproteínas A-I (apo A-I) também interagem com receptores.

Estes resultados indicam que diferentes receptores na BHE podem ser utilizados para o transporte de fármacos. Por outro lado, alguns receptores estão também presentes em outros sítios do organismo, como os receptores de transferrina (transporte

de ferro para as células) e insulina, constituindo uma limitação para tal abordagem (KREUTER, 2014).

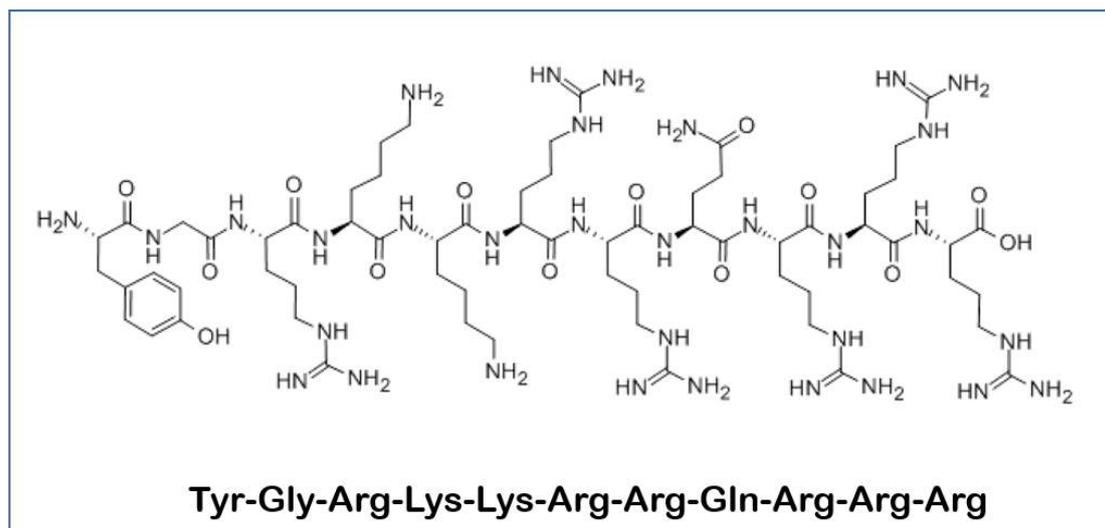
Além das apolipoproteínas, o peptídeo TAT (*trans-activating transcription*) também pode ser utilizado para permitir a passagem das partículas pela BHE (COSTANTINO *et al.*, 2005; TOSI *et al.*, 2007; TORCHILIN, 2008; MALHOTRA e PRAKASH, 2011; WONG *et al.*, 2012; KREUTER, 2014). A molécula TAT é classificada como um peptídeo de penetração celular. Estes peptídeos contêm uma sequência menor que 20 aminoácidos, rica em resíduos básicos e que possuem a capacidade de se deslocar através da membrana plasmática. Além disso, o peptídeo TAT é derivado da proteína codificada pelo ativador da transcrição do vírus da imunodeficiência humana tipo 1, sendo classificado também como um peptídeo derivado de proteína (BEGLEY, 2004; TORCHILIN, 2008; WONG *et al.*, 2012).

A sequência de aminoácidos do peptídeo TAT é representada na Figura 2.6 e se estende do resíduo 47 a 57, composto por dois aminoácidos lisina e seis aminoácidos arginina, que conferem caráter catiônico ao peptídeo (TORCHILIN, 2008; CIONANASU *et al.*, 2010; MALHOTRA e PRAKASH, 2011). A presença destes aminoácidos na estrutura resulta na presença de grupos amino livres na cadeia, além daqueles presentes na porção terminal.

A entrada do peptídeo de penetração na célula pode ser realizada de duas formas: via penetração direta ou entrada mediada por endocitose. A penetração direta envolve um processo independente de energia por translocação celular e interações eletrostáticas. No processo mediado por endocitose, a membrana plasmática se dobra e envolve a substância transportada do meio exterior para o interior da célula. Este processo requer energia celular. As principais pesquisas mostram que o peptídeo TAT é internalizado por endocitose (CIONANASU *et al.*, 2010; ZOU *et al.*, 2013).

Estudos realizados por COSTANTINO *et al.* (2005) mostraram que nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA, modificadas pelo peptídeo TAT foram capazes de atravessar a BHE, permitindo a entrega do fármaco loperamida no SNC após administração intravenosa. Em outro trabalho do grupo, TOSI *et al.* (2007) mostraram mais uma vez a possibilidade de utilização do peptídeo TAT como vetor de associação com receptores nas células cerebrais.

Nanopartículas do tipo casca-núcleo com TAT imobilizado na superfície foram estudadas por LIU *et al.* (2008) para o desenvolvimento de um sistema de transporte de fármaco. As partículas produzidas apresentavam interior hidrofóbico de colesterol, onde o ativo podia ser dissolvido, e casca de poli(etilenoglicol). Os resultados mostraram que a presença do peptídeo TAT possibilitou a passagem do sistema através da BHE.



Tyr – Tirosina
 Gly – Glicina
 Arg – Arginina
 Lys – Lisina
 Gln - Glutamina

Figura 2.6: Sequência de aminoácidos do peptídeo TAT.

RAO *et al.* (2008) sugeriram que certas regiões do peptídeo TAT, conhecidas como domínio de transdução de proteína, podem passar através de membranas biológicas por um mecanismo que é independente de transportadores e da endocitose mediada por receptor. O trabalho mostrou que a utilização de nanopartículas conjugadas com peptídeo TAT permitiu a disponibilização do fármaco no SNC em concentração terapêutica e por tempo prolongado.

CIONANASU *et al.* (2010) mostraram que o peptídeo TAT é capaz de penetrar membranas biológicas e também formar poros de tamanhos nanométricos, que poderiam ser utilizados para passagem de pequenas moléculas. Dessa forma, o peptídeo atua como um vetor para entrega de marcadores, fármacos, proteínas, DNA e nanopartículas.

TIAN *et al.* (2012) mostraram que nanopartículas de gelatina recobertas com poli(etilenoglicol) e funcionalizadas com TAT conseguiram passar pelo sistema de captura retículo endotelial e atravessar a BHE, atingindo o sistema nervoso central, em ensaios realizados com camundongos. As análises foram realizadas por imagens *in vivo* dos animais e microscopia de transmissão de cortes do cérebro.

ANAND *et al.* (2015) desenvolveram um sistema nanométrico com peptídeo TAT imobilizado e marcador de fluorescência, para transporte através da BHE. Os resultados indicaram o transporte através da BHE para os estudos *in vitro* com células de rato e

humanas. Além disso, a translocação pode ser mediada por mais de um mecanismo de absorção, não dependendo unicamente do receptor.

GARTZIANDIA *et al.* (2016) estudaram o transporte de nanopartículas lipídicas e poliméricas para o cérebro pela rota de administração nasal, utilizando peptídeos de penetração celular. A presença do peptídeo na superfície das partículas contribuiu para o transporte, garantindo uma maior concentração de partículas no alvo.

Estes estudos evidenciam a potencial aplicação do transporte mediado por peptídeos de penetração celular, como o TAT, no desenvolvimento de sistemas de nanopartículas aplicadas ao tratamento de doenças relacionadas ao SNC.

2.2.3 Principais doenças que atingem o sistema nervoso central

A incidência de distúrbios neurológicos, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla e tumores cerebrais, tem aumentado principalmente devido ao envelhecimento da população. Os distúrbios neurodegenerativos englobam uma série de condições caracterizadas pela perda persistente e progressiva dos neurônios (WONG *et al.*, 2012). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo em 2010 conviviam com o mal de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa e ainda sem cura, que afeta cerca de 5% das pessoas com mais de 65 anos e cerca de 20% daquelas com mais de 80 anos. No Brasil não há estatísticas que indiquem o índice de pessoas afetadas, mas pode-se estimar, com base nas pesquisas feitas nos Estados Unidos, que no país existem entre 500 mil e um milhão de pessoas portadoras da doença.

As causas da doença de Alzheimer ainda não são completamente conhecidas. A doença é tipicamente caracterizada pela morte dos neurônios, reduzindo a quantidade de conexões. O primeiro sintoma relatado pelos pacientes é a perda de memória (KANDEL *et al.*, 2014). À medida que a doença progride, outras capacidades cognitivas ficam prejudicadas (BANKS, 2012; KANWAR *et al.*, 2012). As características patológicas da doença são evidenciadas pela presença de placas β -amilóides e emaranhados neurofibrilares de proteína tau. Estes emaranhados formam depósitos insolúveis que se acumulam no cérebro. Como resultado, causam um efeito destrutivo dos neurônios e aumentam o estresse oxidativo (ABBOTT *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2012; KANDEL *et al.*, 2014).

O diagnóstico precoce da doença de Alzheimer é dificultado pela sutileza das alterações cognitivas que ocorrem no início. Os tratamentos disponíveis não podem

parar a progressão da demência, de forma que recentes abordagens terapêuticas procuram deter a neurodegeneração antes que os danos irreversíveis se acumulem. O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis se faz ainda necessário (KANDEL *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015).

A doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração de neurônios localizados na região do encéfalo. Os sintomas dependem principalmente do tipo de neurônio degradado e incluem redução do controle motor, falta de equilíbrio, tremor e rigidez muscular (MODI *et al.*, 2010). De modo semelhante à doença de Alzheimer, o tratamento disponível para a doença de Parkinson é sintomático. Muitos fatores podem contribuir para o desenvolvimento da doença, como envelhecimento incorreto de proteínas, inflamação de neurônios e formação de espécies reativas de oxigênio, além da perda da integridade da BHE (KANWAR *et al.*, 2012).

O número de pessoas que sofrem com doenças relacionadas ao SNC vem crescendo, de modo que existe uma demanda urgente pelo desenvolvimento de métodos de tratamento eficientes, capazes de favorecer a passagem de moléculas terapêuticas pela BHE.

Para os casos de doenças crônicas, as nanopartículas podem gerar problemas de acumulação no SNC, uma vez que a administração de fármaco é frequente (KREUTER, 2014). Por isso, o uso de partículas degradáveis e o estudo de outros mecanismos de eliminação das partículas devem ser também encorajados.

Segundo KREUTER (2014), uma das áreas mais promissoras para a utilização de sistemas de liberação de fármaco mediado por nanopartículas é o tratamento de tumores cerebrais. Estes tumores representam uma das formas de câncer humano mais agressivo e o prognóstico para pacientes continua muito desfavorável. Embora sejam caracterizados por rápida proliferação, crescimento difuso e extenso edema cerebral, a destruição da BHE é um evento local. Por esta razão, os fármacos anticancerígenos podem penetrar nas áreas do tumor, mantendo a concentração nas regiões periféricas em níveis mais baixos ou não detectáveis.

2.3 POLÍMEROS PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A pesquisa e desenvolvimento de materiais poliméricos contribuíram para o progresso de diversas tecnologias de sistemas de liberação de fármacos. Nas últimas décadas, houve considerável aumento do interesse por essa tecnologia, evidenciado por meio do maior número de publicações e patentes na área (KIM *et al.*, 2009; TIAN *et*

al., 2012; PARK, 2014). A seleção de materiais de partida para o desenvolvimento de sistemas aplicados as áreas farmacêutica e médica é rigorosa quanto à biossegurança (WONG *et al.*, 2012).

Os polímeros usados como biomateriais são comumente denominados “biopolímeros”. Uma grande variedade de materiais poliméricos vem sendo utilizada em aplicações biomédicas, principalmente devido às características físico-químicas biocompatíveis (ORÉFICE, 2012).

Os materiais poliméricos podem ser trabalhados para garantir propriedades interessantes, em especial para a utilização como excipientes para a liberação de fármacos. É possível alterar grupos químicos pertencentes à cadeia do polímero e, dessa forma, modificar a superfície exposta, o que permite estabelecer novas interações entre o material e o meio de contato. Tal característica permite o controle e a liberação localizada dos princípios ativos nos tecidos (MALHOTRA e PRAKASH, 2011; WANG e VON RECUM, 2011; MENDES *et al.*, 2012).

A escolha de um polímero para um sistema de liberação de fármacos depende de vários fatores, que incluem as propriedades do princípio ativo e do material, além da aplicação desejada (TIAN *et al.*, 2012).

Até recentemente, os polímeros eram escolhidos de maneira a provocar a mínima reação possível no tecido corpóreo. Dessa forma, o conceito de biocompatibilidade estava ligado à ideia de inerticidade; ou seja, o material não poderia interagir com as estruturas biológicas. Atualmente, uma nova visão aponta para sistemas capazes de se comunicarem com os tecidos, sem perda de viabilidade. Dessa forma, os polímeros utilizados nos sistemas de liberação controlada de fármacos devem ser não carcinogênicos, hipoalergênicos e não causarem resposta inflamatória no local de aplicação (KREUTER, 2014).

Muito se discute na literatura a respeito da concepção de sistemas para aplicações biomédicas a partir de materiais biodegradáveis ou não biodegradáveis. A biodegradabilidade não pode ser considerada necessariamente como uma exigência para a utilização do material, pois, uma vez que o polímero não cause danos aos tecidos e células do organismo (apresente biocompatibilidade), sua utilização como um biomaterial pode ser plenamente justificada. Assim, os sistemas de liberação de fármacos podem ser baseados no uso de polímeros de origem natural ou sintética, assim como aqueles biodegradáveis ou não biodegradáveis (ORÉFICE, 2012).

2.3.1 Polímeros biodegradáveis

Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos tem sido estudada para o desenvolvimento de dispositivos para a liberação controlada de fármacos. A biodegradação envolve um processo natural em que os polímeros são convertidos a compostos mais simples. ORÉFICE (2012) destacam algumas distinções importantes: o processo de degradação pode ser determinado por agente biológico, denominado biodegradação; ou incluir processos físicos e químicos, chamado neste caso de bioerosão. Além disso, os materiais podem ser biodegradáveis ou biorreabsorvíveis. No primeiro caso, o material é quebrado *in vivo* e não é eliminado pelo organismo, enquanto no segundo, o material é eliminado do corpo.

Dentre os polímeros naturais mais utilizados em aplicações biomédicas, citam-se a quitina, a quitosana, o alginato, os copolímeros à base de ácido hialurônico e a gelatina. Dentre os polímeros sintéticos, os mais comumente encontrados em aplicações biotecnológicas são os polianidridos, os poliuretanos, os poliaminoácidos, os poli(orto-ésteres) e os poliésteres (UHRICH *et al.*, 1999; TIAN *et al.*, 2012).

Os polianidridos estão entre os polímeros mais reativos e hidroliticamente instáveis dentre aqueles usados como biomateriais. Devido à elevada reatividade, os polianidridos são facilmente degradados. A maioria dos polianidridos utilizados na área biomédica é baseada no ácido sebácico ($C_{10}H_{18}O_4$) e produzida por polimerização de condensação. Estudos de toxicidade mostram satisfatória biocompatibilidade do material (UHRICH *et al.*, 1999).

Além dos polianidridos, os poliuretanos apresentam muitas aplicações biomédicas devido à boa biocompatibilidade, flexibilidade e degradabilidade. A funcionalização desses polímeros pode melhorar suas propriedades, como a atividade biológica e a hidrofiliabilidade (TIAN *et al.*, 2012).

Os poliaminoácidos são utilizados predominantemente para sistemas de liberação de fármacos de baixa massa molar. As cadeias laterais de aminoácidos oferecem grupos químicos para a ligação de fármacos ou agentes de ligação cruzada que podem ser usados para modificar as propriedades físicas e mecânicas do polímero. Porém, a natureza antigênica torna a utilização biomédica destes materiais ainda não completamente validada. Outra preocupação com os poliaminoácidos é a estabilidade hidrolítica intrínseca da ligação amida, que requer enzimas de clivagem de ligação para degradação. A dependência de enzimas geralmente resulta em fraca liberação controlada *in vivo* (TIAN *et al.*, 2012).

Os poli(orto-ésteres) são úteis para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. A motivação para a utilização é que estes sistemas permitem a liberação do fármaco somente após a hidrólise das cadeias do polímero na superfície do dispositivo, inibindo a disponibilização por mecanismos de difusão (UHRICH *et al.*, 1999).

Os poliésteres são os sistemas mais bem caracterizados e amplamente estudados em processos de liberação de fármacos. A síntese dos polímeros policaprolactona (PCL), poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ácido lático) (PLA) é baseada na abertura do anel do monômero cíclico correspondente. A polimerização espontânea da lactona normalmente é lenta para a produção de materiais de alta massa molar, sendo necessária a utilização de um catalisador (UHRICH *et al.*, 1999).

O PGA é um poliéster alifático que apresenta alta cristalinidade, elevado ponto de fusão e baixa solubilidade em solventes orgânicos. Estas características tornam a utilização do PGA geralmente limitada. Com o objetivo de adaptar as propriedades do PGA para maior número de aplicações, o uso do PLGA, um copolímero formado pelos monômeros ácido glicólico e ácido lático, vem sendo investigado (KREUTER, 2014).

Segundo KREUTER (2014), os polímeros mais estudados para utilização em sistemas de liberação de fármacos no SNC são o PLGA e aqueles baseados em poli(alquil ciano acrilatos), como o poli(cianoacrilato de butila) (PBCA), principalmente devido à rápida biodegradação no organismo, minimizando efeitos tóxicos e de acumulação (WONG *et al.*, 2012). O desenvolvimento de sistemas baseados em polímeros biodegradáveis deve atentar para a possível toxicidade dos produtos de degradação, que é um tema ingenuamente ignorado em muitas discussões, já que não é óbvio que os produtos de degradação são inofensivos e podem ser eliminados pelo organismo.

2.3.2 Polímeros não biodegradáveis

Os polímeros não biodegradáveis normalmente utilizados em sistemas de liberação de fármaco são o poli(álcool vinílico)(PVA), poli(etileno-co-acetato de vinila) (EVA), silicone e poli(metacrilato de metila) (PMMA) (SHASTRI, 2003; FU e KAO, 2010). A liberação do fármaco a partir de polímeros não biodegradáveis se dá basicamente por difusão das moléculas inicialmente contidas na matriz. O perfil de liberação normalmente não apresenta explosão inicial, que é muito comum em outros sistemas. Dessa forma, a cinética de liberação pode ser mais bem controlada (FU e KAO, 2010).

2.3.3 O poli(metacrilato de metila)

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) é um polímero termoplástico do grupo dos acrílicos e pode ser utilizado para o preparo de sistemas para liberação de fármacos por apresentar boa biocompatibilidade (MENDES *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2013; FEUSER *et al.*, 2014). O polímero é normalmente obtido pela reação de adição via radicais livres do monômero precursor, o metacrilato de metila (MMA), como mostrado na Figura 2.7.

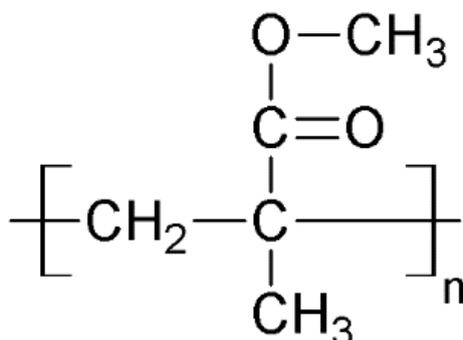


Figura 2.7: Estrutura química do PMMA.

O mecanismo cinético das reações via radicais livres envolve três etapas básicas, conhecidas como iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação são gerados os radicais livres que dão início à reação, com a formação de um centro ativo que garante o crescimento da cadeia polimérica, chamado polímero “vivo”. Na etapa seguinte, o crescimento da cadeia ocorre por meio de sucessivas incorporações de unidades monoméricas ao polímero “vivo”. Ao final, a etapa de terminação compreende na perda de atividade do centro ativo, gerando uma cadeia de polímero “morto” (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Na reação, o iniciador atua na abertura da dupla ligação vinílica do monômero, provocando o crescimento da cadeia. O processo é normalmente muito rápido e caracterizado por atingir conversões muito próximas a 100%, o que resulta em materiais de alta massa molar (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Partículas de PMMA podem ser produzidas por polimerização em emulsão, miniemulsão ou suspensão, dependendo da aplicação pretendida (YUAN *et al.*, 2013).

O PMMA é classificado como um material duro e rígido, porém quebradiço, apresentando temperatura de transição vítrea em torno de 105 °C (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Devido às boas propriedades ópticas, de resistência mecânica e estabilidade, o PMMA encontra ampla aplicação comercial. Na área biomédica, o polímero vem sendo

utilizado principalmente como cimento ósseo e dental, no desenvolvimento de implantes permanentes para lentes intra-oculares, em cirurgias plásticas e no revestimento de formulações para administração oral (SHASTRI, 2003; GRAÇA *et al.*, 2017).

2.3.4 O poli(ácido acrílico) e o poli(ácido metacrílico)

O poli(ácido acrílico) (PAA) e o poli(ácido metacrílico) (PMAA) são também polímeros da família dos acrilatos e são obtidos a partir dos respectivos monômero ácido acrílico (AA) e ácido metacrílico (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). A Figura 2.8 apresenta a estrutura química do PAA e do PMAA. Os polímeros produzidos com base nesses monômeros apresentam alta solubilidade em água.

A síntese de copolímeros acrílicos é bem conhecida na literatura e pode ser utilizada para obter sistemas com melhor controle de distribuição de tamanhos, além de permitir a inserção de grupos funcionais na superfície do polímero, o que pode contribuir para melhoria das propriedades de biocompatibilidade, adesão e estabilidade (PEIXOTO *et al.*, 2016). A utilização do ácido acrílico ou do ácido metacrílico como comonômero permite a inserção de sítios ácidos no polímero final, que podem então ser utilizados como centros ativos de reações posteriores. Além disso, a presença do ácido confere maior hidrofiliabilidade ao polímero, podendo alterar favoravelmente as propriedades superficiais das partículas poliméricas.

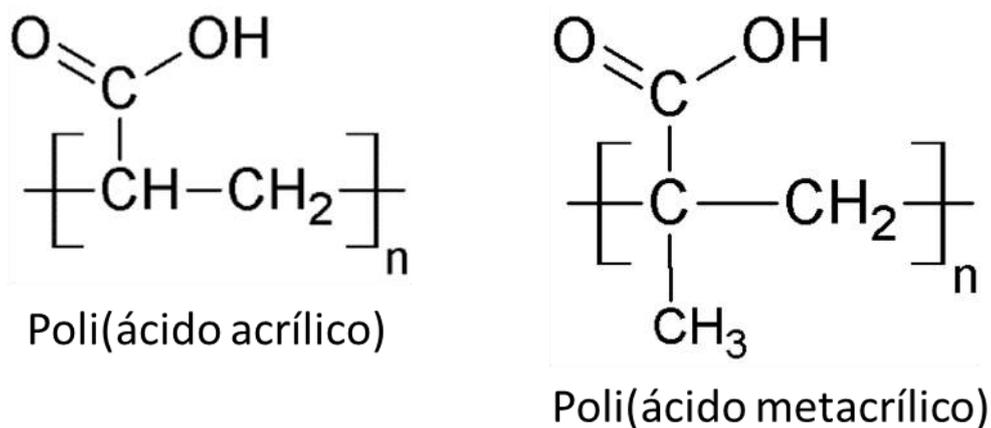


Figura 2.8: Estruturas químicas do PAA e do PMAA.

2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nas últimas décadas, nanomateriais poliméricos têm recebido grande atenção dos pesquisadores devido às propriedades especiais que podem ser obtidas a partir dos tamanhos pequenos. Por exemplo, a elevada área específica adquirida em sistemas de pequena dimensão garante propriedades desejáveis para a aplicação em diversos campos.

As nanopartículas poliméricas são estruturas usualmente sólidas e esféricas que podem ser preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Encontra-se na literatura uma classificação de tamanhos variável para estes sistemas. De acordo com a ASTM (2012), devem ser consideradas nanopartículas aquelas estruturas que apresentam ao menos duas dimensões na faixa entre 1 nm e 100 nm. No entanto, para fins farmacêuticos, de acordo com a União Europeia, podem ser classificados como nanopartículas os sistemas que apresentam ao menos uma dimensão com tamanho menor que 1000 nm e que sejam biologicamente ativos, tendo em particular a capacidade de veicular um fármaco (European Commission, 2012; WONG *et al.*, 2012).

O agente terapêutico pode estar aprisionado na matriz polimérica ou na superfície da partícula, por conjugação ou adsorção (WONG *et al.*, 2012). A carga útil de fármaco diminui com a redução do tamanho de partícula; porém, partículas com tamanho maior que 1000 nm podem causar embolização pulmonar ou se acumularem no fígado e baço. Além disso, partículas muito pequenas podem ser rapidamente eliminadas pelos rins (KREUTER, 2014). Dessa forma, partículas poliméricas com tamanho entre 20 e 100 nm apresentam maior potencial para aplicações *in vivo*, devido à capacidade de circular no sangue por longos períodos de tempo (ELSABAHY e WOOLEY, 2012)

As nanopartículas constituem sistemas muito estudados na área farmacêutica nas últimas décadas, com o objetivo específico de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos (BERTRAND e LEROUX, 2012). Existe uma grande variedade de medicamentos que pode ser disponibilizado a partir de sistemas nanoparticulados, baseados em fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, vacinas e macromoléculas biológicas (KREUTER, 2014).

A multifuncionalidade das nanopartículas desempenha um papel importante na concepção de veículos de disponibilização de fármacos em tecidos alvo. A entrega de fármacos ao SNC apresenta grandes desafios, como a passagem seletiva das partículas pela BHE e a manutenção do fármaco sem que ocorra a degradação e na concentração terapêutica desejada (MALHOTRA e PRAKASH, 2011).

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas é uma área de pesquisa interessante e desafiadora. Partículas com dimensões pequenas garantem baixa irritação, biodisponibilidade adequada e compatibilidade com os tecidos. O uso da nanotecnologia em sistemas de disponibilização de fármacos pode conduzir à solução de diversas questões relacionadas à solubilidade de medicamentos, prolongamento da exposição ao princípio ativo por liberação controlada e permeação do fármaco. Por isso, a nanotecnologia pode vir a constituir a melhor ferramenta para o tratamento de doenças crônicas, em que a administração do fármaco é frequente (KREUTER, 2001).

Quando os nanomateriais são introduzidos em ambientes biológicos, efeitos como agregação, coagulação e absorção podem ocorrer. Estes efeitos podem ser devidos às inúmeras interações que ocorrem nas interfaces do nanomaterial e das biomoléculas e fluidos. As propriedades das nanopartículas, tais como carga superficial, hidratação, distribuição de tamanhos, dispersão, estabilidade, aglomeração e agregação são dependentes das condições do meio, como pH, temperatura e presença de macromoléculas biológicas ou orgânicas (LIN *et al.*, 2014). Estas propriedades devem ser bem estudadas e caracterizadas para a concepção de um sistema carreador de fármacos.

Os problemas associados às nanopartículas poliméricas são relacionados aos resíduos de solventes orgânicos gerados durante o processo de produção, à possível toxicidade do polímero e ao aumento da escala para a aplicabilidade industrial. As nanopartículas apresentam alta energia de superfície, o que aumenta a possibilidade de aglomeração, tornando-se instáveis (MEHNERT e MADER, 2012).

Encontram-se descritas na literatura várias técnicas para o preparo de nanopartículas contendo ativos. Dependendo do método utilizado, a organização estrutural pode ser diferente. As moléculas ativas podem estar retidas na matriz polimérica, encapsuladas em um núcleo, estar quimicamente conjugadas ao polímero ou adsorvidas em sua superfície. Assim, distinguem-se duas organizações principais: as nanocápsulas e as nanoesferas, como mostrado na Figura 2.9.

As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco se encontra no interior de uma cavidade oleosa ou aquosa, revestida por uma membrana polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais, em que o fármaco pode estar disperso ou adsorvido. Estes sistemas podem aumentar a solubilidade do fármaco, proteger as substâncias de degradação e ainda modificar o perfil de distribuição no organismo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

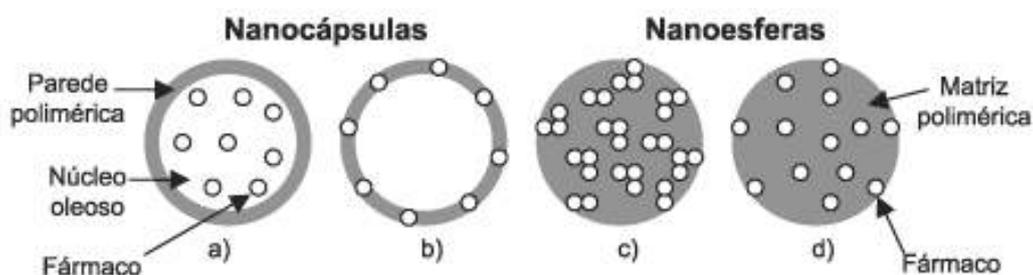


Figura 2.9: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas, sendo que o fármaco se encontra: a) dissolvido no núcleo; b) adsorvido à parede; c) retido na matriz; d) adsorvido ou disperso na matriz da nanopartícula polimérica.

SCHAFFAZICK *et al.* (2003).

A incorporação de fármaco às nanopartículas pode se dar durante a produção da nanopartícula ou por adsorção à superfície do material pré-formado. A conjugação *in situ* garante maior proteção do princípio ativo contra uma possível degradação e fagocitose pelas células do organismo, além de permitir o encapsulamento com elevada eficiência. Em relação ao processo de liberação do fármaco, as nanopartículas podem permitir uma liberação de forma controlada (KANWAR *et al.*, 2012).

2.4.1 Técnicas para o preparo de nanopartículas

De maneira geral, são empregadas duas principais estratégias para o preparo de sistemas de nanopartículas poliméricas: a dispersão de polímeros pré-formados e a polimerização dos monômeros. Assim, várias técnicas podem ser utilizadas, como evaporação de solvente, *salting-out*, nanoprecipitação, polimerização em emulsão e miniemulsão (THICKETT e GILBERT, 2007; SOUTO *et al.*, 2012).

Na maioria das técnicas que trabalham com os polímeros pré-formados, são utilizados solventes orgânicos na etapa de dissolução do material. Estes solventes podem gerar problemas relacionados à toxicidade e ao risco ambiental, quando o descarte é realizado de maneira incorreta. Além disso, os resíduos de solvente devem ser removidos do produto final. Com o objetivo de encapsular compostos nas nanopartículas, as técnicas baseadas na polimerização dos monômeros permite a inserção com maior eficiência e em uma única etapa de reação. Independentemente do método de preparo empregado, os produtos são usualmente obtidos como suspensões coloidais aquosas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

PAIVA *et al* (2016) avaliou três técnicas de preparo de sistemas nanométricos (lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas) para a encapsulamento de filtros solares. Os resultados mostraram que, dentre estas, as nanopartículas poliméricas produzidas por polimerização em miniemulsão garantiram maiores eficiências de encapsulamento e a obtenção de produtos mais estáveis e homogêneos.

2.4.2 Polimerização por emulsão e miniemulsão

A técnica de polimerização em emulsão é um processo heterogêneo em que os monômeros são dispersos em uma fase contínua, normalmente constituída por água e um surfactante, e são polimerizados por radicais livres provenientes da decomposição de um iniciador solúvel na fase contínua. O produto desta reação é uma dispersão estável de um polímero, denominada látex (THICKETT e GILBERT, 2007).

A polimerização em emulsão possibilita a obtenção de polímeros com diferentes características, como composição, distribuição de massa molar e grau de cristalinidade, bem como látices com diferentes propriedades coloidais, como morfologia, distribuição de tamanhos de partículas e capacidade de formação de filmes. O processo apresenta ainda as seguintes vantagens: melhor dissipação de calor durante a reação, com a utilização de água como fase contínua; ausência de solventes orgânicos; produto final fluido e obtenção de polímeros com massa molar elevada; e velocidade relativamente alta de reação, quando comparada com outras técnicas (THICKETT e GILBERT, 2007).

O sistema de polimerização em emulsão típico, conforme apresentado por SOUTO *et al.* (2012) e PEIXOTO (2013), é inicialmente constituído por uma dispersão de gotas de monômero estabilizada pelo emulsificante (denominada fase orgânica), pelas micelas formadas pelo agente surfactante (inchadas com monômero) e pela água. Adicionando-se um iniciador solúvel na fase aquosa, a polimerização nas gotas é evitada, ocorrendo preferencialmente a nucleação das micelas (nucleação micelar). Com a formação de polímero nas micelas e conseqüente redução da concentração de monômero, surge uma pressão osmótica que faz com que os monômeros das gotas migrem para as micelas, dando continuidade à polimerização. No entanto, o processo é limitado pela taxa de difusão do monômero contido nas gotas através da fase aquosa para abastecimento das micelas. Na Figura 2.10 é apresentado um esquema ilustrativo do mecanismo de polimerização em emulsão.

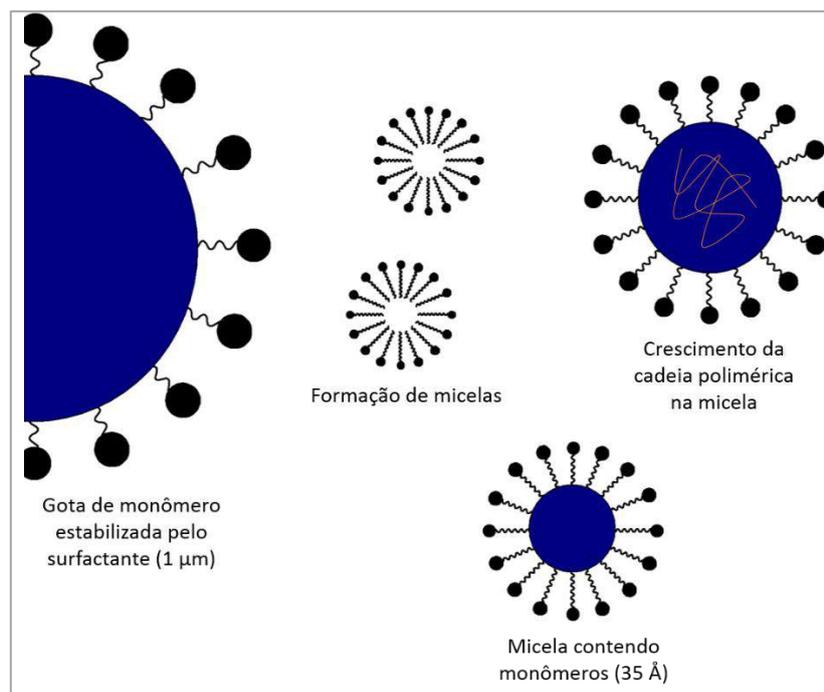


Figura 2.10: Representação esquemática da polimerização em emulsão.

Em adição ao processo de polimerização em emulsão, as miniemulsões tornaram-se alvo de muitos estudos. Neste caso, são formadas gotas de monômero com tamanho consideravelmente menor e, portanto, maior superfície específica, prevalecendo o mecanismo de nucleação das gotas, o que dispensa a formação de micelas de surfactante. A polimerização se processa de forma isolada, não ocorrendo transferência de monômero via difusão pela fase aquosa, sendo caracterizada pela formação de partículas com tamanhos de 50 a 500 nm (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002).

Em geral, as miniemulsões consistem em pequenas gotículas estáveis, distribuídas em uma fase contínua. O sistema é obtido por meio da aplicação de cisalhamento elevado, utilizando técnicas de ultrassom ou homogeneizadores de alta pressão. A estabilidade das gotículas é assegurada pela adição de um co-estabilizador. O co-estabilizador apresenta baixa solubilidade na fase contínua e garante uma barreira de difusão do monômero para o meio aquoso, o que dificulta o transporte das gotas pequenas para as grandes e a perda de estabilidade (LANDFESTER, 2009). A Figura 2.11 apresenta um esquema ilustrativo do mecanismo de polimerização em miniemulsão.

Para a polimerização em miniemulsão, dois mecanismos de nucleação diferentes são possíveis. O primeiro e preferível é o mecanismo de nucleação nas gotas, em que a polimerização é iniciada por radicais que entram nas gotículas de monômeros, promovendo a produção de partículas poliméricas com tamanhos similares aos das

gotas de monômeros. O segundo mecanismo possível é a nucleação homogênea. Neste caso, a polimerização ocorre inicialmente na fase aquosa e as partículas são formadas pela agregação ou precipitação dos oligômeros. Esta forma de nucleação deve ser normalmente evitada, pois leva a distribuições de tamanho de partículas largas e bimodais (ZIEGLER *et al.*, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2016).

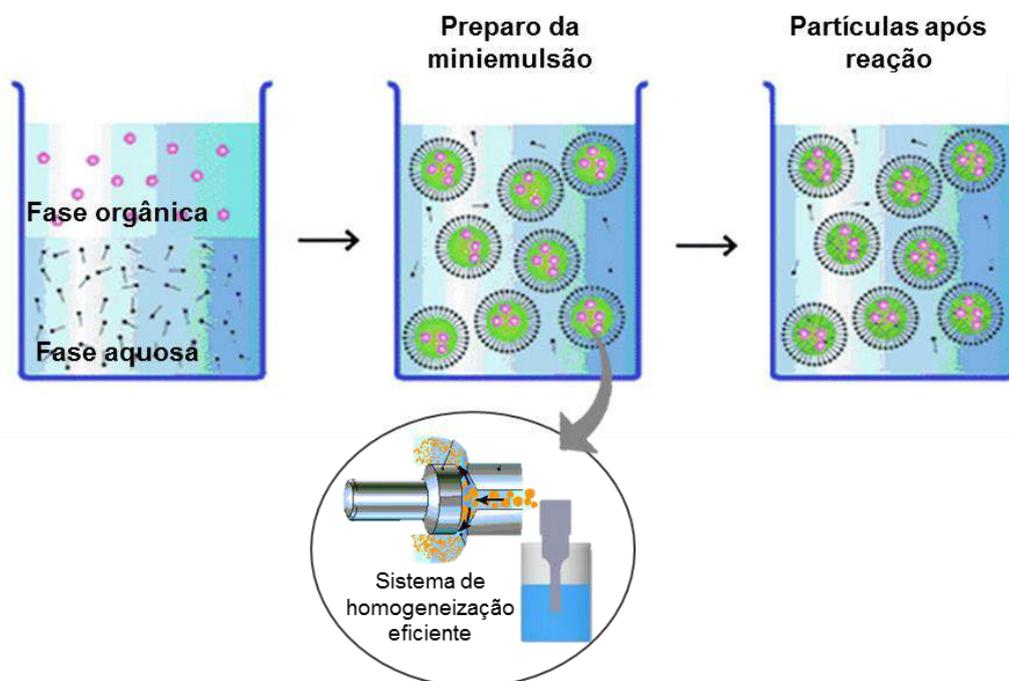


Figura 2.11: Representação esquemática da polimerização em miniemulsão.

As principais características das miniemulsões foram enumeradas por ANTONIETTI e LANDFESTER, (2002) e por CAPEK (2010):

- 1) A formação da miniemulsão requer a utilização de um sistema eficiente de dispersão. O tamanho da gota ao longo do processo de emulsificação é direcionado para um estado de equilíbrio dinâmico entre as taxas de aglomeração e quebra das gotas;
- 2) A estabilidade parcial das gotas após a dispersão sob cisalhamento elevado é obtida por meio da utilização de um agente osmótico, o co-estabilizador, que não se difunde entre as gotículas individuais. Devido à presença do co-estabilizador, uma pressão osmótica é criada, que compensa a pressão de Laplace causada pela energia de interface, que promove a transferência de massa das pequenas gotas para as grandes gotas;

- 3) A ocorrência de coalescência entre as gotas é diminuída pela adição de surfactante. A concentração do surfactante na miniemulsão deve encontrar-se abaixo da concentração micelar crítica (CMC), garantindo a não formação de micelas e a prevalência do mecanismo de polimerização por nucleação homogênea das gotas.
- 4) A quantidade de agente tensoativo e a cobertura da superfície das gotas relaciona-se com o tamanho de partícula resultante da polimerização, sendo que o aumento da concentração de surfactante contribui para a diminuição do tamanho da partícula. Quanto menor é o tamanho das partículas, maior é a cobertura necessária por surfactante;
- 5) A polimerização por miniemulsão pode ser iniciada a partir de iniciadores hidrofílicos ou hidrofóbicos. No caso do iniciador solúvel em água, a formação do radical livre ocorre na fase contínua e o processo de início da polimerização é semelhante ao da emulsão convencional. O iniciador hidrofóbico pode ser utilizado na polimerização de monômeros com alta afinidade pela água, com o objetivo de prevenir a ocorrência de nucleação homogênea na fase aquosa.

A polimerização em miniemulsão é uma técnica de polimerização que tem permitido muitos avanços na área biomédica. A técnica apresenta muitas vantagens, como a redução da quantidade de surfactante adicionada e a não utilização de solventes orgânicos. Além disso, permite a síntese de produtos nanométricos com maior estabilidade e possibilidade de encapsulamento durante a reação de polimerização.

Apesar do apelo ambiental associado à redução da utilização de solventes orgânicos, a técnica de polimerização em miniemulsão não é normalmente escolhida nos processos convencionais, já que o tamanho final reduzido das partículas poliméricas confere uma dificuldade operacional considerável para a separação. As técnicas disponíveis para obtenção das partículas secas, como secagem em estufa e liofilização, podem não ser adequadas, uma vez que há perda da integridade do material por aglomeração ou laminação. Dessa forma, é preferível a utilização do produto final na forma de látex.

CRESPY e LANDFESTER (2010) salientaram que a técnica de polimerização em miniemulsão permite modificações específicas na superfície do polímero por intermédio da adição de grupos funcionais, que são de grande importância para muitas aplicações, como na incorporação de biomoléculas às nanopartículas por ligações covalentes.

PICHOT (2004) ressaltou alguns critérios normalmente necessários para que as nanopartículas fabricadas via polimerização em miniemulsão atendam às exigências para posterior funcionalização pela imobilização de ligantes específicos. O tamanho e a distribuição de tamanhos são importantes parâmetros que controlam a superfície disponível para adesão e a uniformidade do produto final. A densidade de cargas na superfície das partículas relaciona-se com as possíveis interações entre o polímero e o ligante. Além disso, a presença de grupos biorreativos é necessária para que seja possível realizar a imobilização covalente.

A técnica de polimerização em miniemulsão foi utilizada por HOLZAPFEL *et al.* (2005) para conduzir a copolimerização de estireno com ácido acrílico para emprego do produto como marcador celular. O ácido acrílico foi utilizado com o intuito de aumentar a densidade de cargas na superfície do polímero. Os resultados mostraram que o tamanho da partícula relaciona-se com a quantidade de ácido acrílico incorporado no copolímero. Para proporções maiores que 15% de AA observou-se um aumento no diâmetro médio, além da formação das chamadas “*hairy layers*” na superfície das partículas, principalmente compostas por poli(ácido acrílico), solúvel em água, o que contribui para a diminuição da estabilidade.

ZIEGLER *et al.* (2009) sintetizaram partículas à base de estireno e metacrilato de metila contendo grupos fosfato, por meio da copolimerização em miniemulsão com ácido vinil fosfônico. O estudo da cinética de polimerização mostrou que, para as partículas à base de estireno, o sistema apresentou comportamento típico de miniemulsão, prevalecendo o mecanismo de nucleação nas gotas. Já na reação com metacrilato de metila, o principal mecanismo observado foi de nucleação homogênea. Este comportamento foi atribuído à diferença de solubilidade dos monômeros na água.

A técnica de copolimerização por miniemulsão de MMA com diversos monômeros solúveis em água foi estudada por PEIXOTO *et al.* (2016). Os produtos obtidos apresentaram propriedades de tamanho e superfície diferentes, dependendo do comonômero e do tipo de iniciador utilizado na reação. Os materiais produzidos com iniciador orgânico apresentaram distribuições de tamanho mais homogêneas, indicando que o mecanismo de nucleação de gotas foi preferencial.

2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) distingue o termo "polímero funcional" de duas maneiras: um polímero contendo grupos funcionais

(grupos hidroxí, carboxí ou amino), que tornam o substrato reativo; ou um polímero que desempenha uma função específica, que neste caso pode ser uma função química ligada à reatividade ou a uma aplicação física, como condutividade elétrica. Os polímeros contendo grupos funcionais reativos são geralmente considerados capazes de sofrer reações químicas (HORIE *et al.*, 2004).

Segundo a IUPAC, um polímero funcional é aquele que apresenta reatividade química específica ou cujos usos físicos, biológicos ou farmacológicos dependem de grupos químicos específicos. Dessa forma, a funcionalização de um polímero é a introdução de grupos químicos desejados para criar uma estrutura específica com propriedades físicas, biológicas e farmacológicas diferenciadas (HORIE *et al.*, 2004).

A funcionalização das nanopartículas poliméricas por meio da inserção de grupos reativos pode ser considerada como um pré-requisito para sua utilização na área biomédica (PICHOT, 2004). A inserção dos grupos funcionais nos polímeros pode ocorrer durante a polimerização, com o uso de monômeros específicos, ou por meio de posterior modificação química no polímero (TIAN *et al.*, 2012).

A presença de grupos reativos permite a imobilização de biomoléculas por adsorção física ou pelo acoplamento covalente. No primeiro caso, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas são responsáveis pela ligação do suporte à biomolécula. A imobilização por ligações covalentes é garantida pela presença de certas funções químicas disponíveis nas biomoléculas, como amina, tiol, carboxila e hidroxila (PICHOT, 2004).

O direcionamento das nanopartículas que contêm o fármaco é possível por meio da funcionalização da superfície, garantindo o reconhecimento do ligante. Os receptores presentes na membrana celular permitem as partículas responderem aos estímulos provocados nesse ambiente. A ligação entre os receptores celulares e seus ligantes, que pode incluir proteínas, peptídeos e moléculas sintéticas, é rigorosamente controlada pelas interações físicas, eletrostáticas, hidrofóbicas e hidrofílicas (RODDA *et al.*, 2014).

As nanopartículas que apresentam biomoléculas imobilizadas na superfície constituem entidades de troca dinâmica com o meio envolvente, uma vez que a célula “enxerga e reconhece” estas estruturas. Os processos cinéticos incluem interações entre a partícula e a molécula biológica e entre a partícula e a superfície celular, incluindo os receptores específicos. Observa-se também interação entre a partícula e qualquer molécula livre de elevada afinidade presente no meio e que poderia competir pela superfície da célula, como esquematizado na Figura 2.12. Além disso, múltiplos fatores, como o tamanho e curvatura da superfície da partícula e a natureza química da superfície e do núcleo da partícula, determinam a disposição das biomoléculas (MAHON *et al.*, 2012).

O processo de inserção de unidades biológicas na superfície de nanopartículas tem sido alvo de muitas pesquisas recentes (EHRENBERG *et al.*, 2009; MAHON *et al.*, 2012; WELSCH *et al.*, 2013) e os principais métodos descritos para a funcionalização incluem técnicas de adsorção pela formação de ligações covalentes e/ou interações específicas.

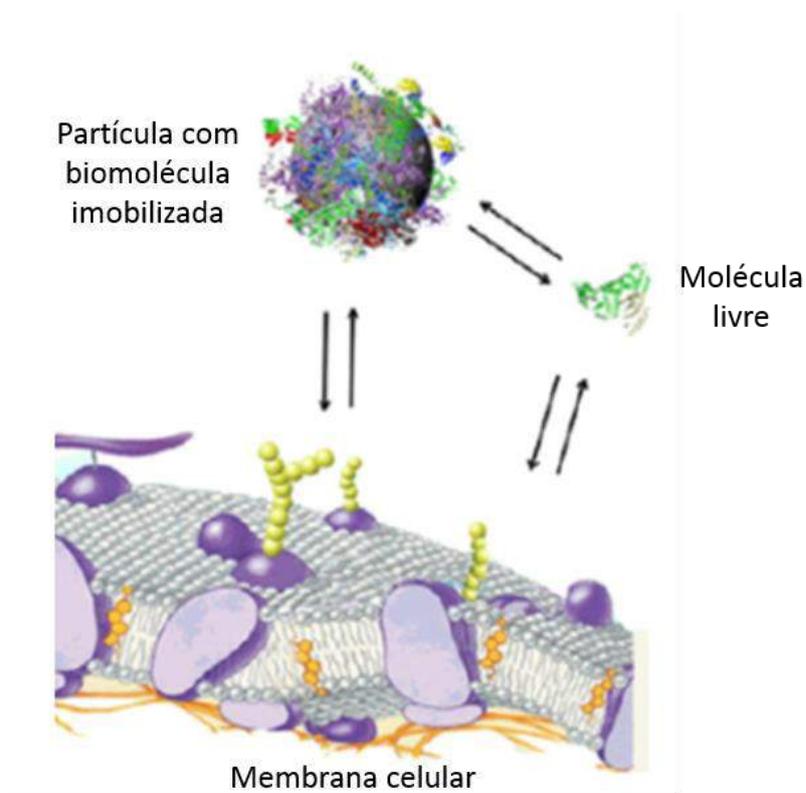


Figura 2.12: Representação esquemática das interações entre a partícula e a célula.

Adaptada de MAHON *et al.* (2012).

2.5.1 Adsorção não específica

A técnica de adsorção não específica envolve o acoplamento do elemento biológico por meio de ligações fracas, tais como forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. A immobilização é alcançada simplesmente pelo contato das partículas com o material biológico pelo tempo suficiente para que o equilíbrio da adsorção seja atingido (WELSCH *et al.*, 2013).

Segundo EHRENBERG *et al.* (2009), as interações hidrofóbicas tendem a dominar o balanço de energia na maioria dos casos, mas as forças eletrostáticas também podem desempenhar um papel importante nesse processo. A determinação do grau de immobilização, afinidades de ligação e estequiometrias de associação entre a

biomolécula e a nanopartícula em fluidos biológicos pode ser particularmente complexa. O entendimento dos mecanismos de adsorção convencional em sólidos é relevante para explicar o comportamento das nanopartículas.

A adsorção não específica é o método mais simples para a imobilização de biomoléculas em nanopartículas; porém, esta metodologia resulta quase sempre em um acoplamento fraco, uma vez que a molécula pode ser facilmente desorvida mediante alterações de condições do meio, como pH, temperatura e força iônica (WELSCH *et al.*, 2013).

2.5.2 Adsorção por ligação covalente

A conjugação por meio de ligação covalente é atraente, pois fornece uma rota para a formação de uma camada biofuncional, sendo a biomolécula ligada de maneira irreversível e estável. Tipicamente, os protocolos de conjugação consideram a disposição dos grupos funcionais na biomolécula e na nanopartícula funcionalizada.

Os procedimentos mais comuns para imobilizar moléculas em suportes que contêm grupos carboxilas, como no caso do presente trabalho, utilizam carbodiimidas. De maneira geral, de acordo com esta rota química, o grupo amina da biomolécula forma uma ligação peptídica com o grupo carboxílico da nanopartícula, constituindo a etapa de ativação. Esta técnica é aplicada à funcionalização de vários tipos de materiais, como sílica, polímeros e ouro (MAHON *et al.*, 2012).

Segundo HERMANSON *et al.* (1992), as carbodiimidas podem ser usadas para facilitar a formação de ligações entre grupos carboxílico e amino. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é bastante utilizado em reações de conjugação, síntese de peptídeos e como agente de imobilização no preparo de géis de afinidade. O EDC é solúvel em água, o que permite a utilização sem a necessidade de prévia dissolução em solventes orgânicos.

O EDC permite a formação da ligação peptídica sem a necessidade da presença de uma molécula de espaçamento. A proposta de reação prevê que o carbono ligado aos nitrogênios da molécula de EDC reaja com o grupo carboxílico do suporte, por exemplo, para formar uma espécie intermediária altamente reativa e instável. Esta espécie ativa reage com uma amina primária na biomolécula para a formação da ligação peptídica. A reação produz ainda um subproduto que é solúvel em água, podendo ser removido com o auxílio de lavagens com água ou solução tampão (HERMANSON *et al.*, 1992). Esta rota para imobilização de biomoléculas é esquematizada na Figura 2.13.

A literatura mostra que a reação de ativação dos grupos carboxílicos ocorre preferencialmente na faixa de pH entre 3,5 e 4,5 enquanto a formação da ligação amida ocorre na faixa de pH entre 4 e 6. Entretanto, a hidrólise máxima do EDC ocorre em meio ácido e a solução torna-se estável em pH maior que 6,5. Dessa forma, a experiência indica que o pH ideal para utilização do EDC situa-se entre 4,5 e 7,5. Além disso, tampões contendo grupos amins livres e carboxílicos devem ser evitados, uma vez que estes podem competir com os grupos do suporte (HERMANSON *et al.*, 1992).

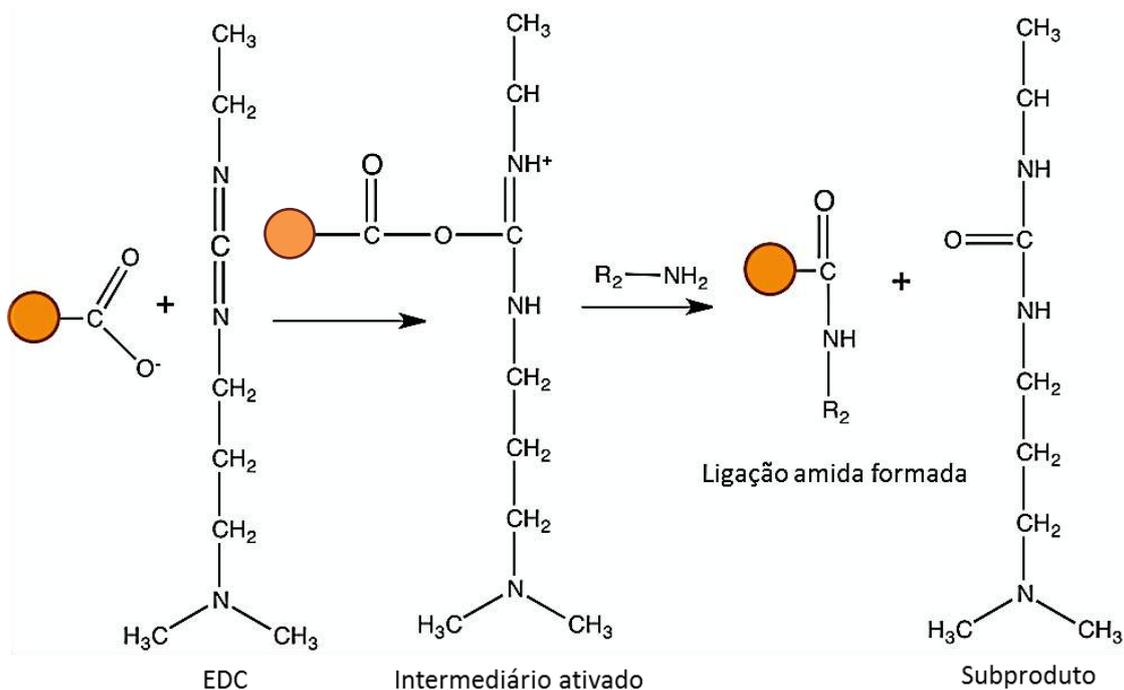


Figura 2.13: Ilustração esquemática da rota química de adsorção utilizando EDC.

MAHON *et al.* (2012) destacaram os principais desafios encontrados para o desenvolvimento de interfaces entre biomoléculas e sistemas nanoestruturados. O sítio ativo do ligante alvo deve estar posicionado de maneira que permita a reação, sendo que o arranjo tridimensional, o número e o espaçamento dos ligantes devem ser considerados. Em relação à biomolécula inserida, esta deve promover a interação com os receptores das células. Além disso, as partículas devem garantir tempo suficiente de circulação no organismo, de modo a aumentar a quantidade que efetivamente atinge o local alvo.

A N-hidroxi-succinimida (NHS) pode também ser utilizada em paralelo com EDC, para a formação de um éster ativado. A vantagem deste método é relacionada à maior estabilidade do composto intermediário formado, o que melhora a formação da ligação peptídica de interesse (HERMANSON *et al.*, 1992).

O sucesso do acoplamento dos intermediários EDC e NHS é dependente da acessibilidade dos grupos carboxílicos no suporte. Caso os grupos terminais apresentem um empacotamento estérico ordenado, a formação do éster intermediário pode ser limitada ou não ocorrer (MALHOTRA *et al.*, 2013).

LIU *et al.* (2008) utilizaram o EDC e NHS como agentes de ativação para a imobilização do peptídeo TAT em nanopartículas. O sistema foi incubado por 1 hora sob refrigeração para ativação, sendo o TAT adicionado logo depois. A partir da análise dos espectros de ¹H-RMN das amostras produzidas, verificou-se o sucesso da inserção do TAT pelo aparecimento de picos característicos dos grupos presentes nos aminoácidos do peptídeo, como aqueles posicionados em 2,52 - 2,58 ppm, relativos à arginina, e 6,6 e 6,9 ppm provenientes do anel aromático da tirosina.

A rota química via EDC foi também utilizada por MALHOTRA *et al.* (2013) para imobilização do peptídeo TAT em partículas de quitosana e poli(etilenoglicol), após inserção de um grupo ácido. Neste trabalho, a etapa de ativação teve duração de 24 horas. A formação da ligação foi verificada por meio de espectros de FTIR, pelo aparecimento de uma banda em 1660 nm, característica da amida.

2.6 FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Um considerável número de moléculas vem sendo estudado para o transporte através da BHE com o auxílio de nanopartículas. Dentre estas, incluem-se fármacos para o tratamento de tumores cerebrais, analgésicos, inibidores de protease e enzimas (WOHLFART *et al.*, 2012).

Segundo KREUTER (2014), a utilização de nanopartículas poliméricas sugere, em princípio, a possibilidade de transporte de todos os tipos de compostos, desde que exista a ligação com um receptor responsável pela transcitose. Esta abordagem é limitada pela quantidade de fármaco necessária para alcançar o efeito terapêutico desejado e também pela quantidade de polímero, quando doses frequentes são requeridas. Como a disponibilização de fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas é restringida pela passagem através da BHE, o estudo de nanopartículas poliméricas é de grande interesse.

Alguns fármacos apresentam limitações em relação à terapia oral, mais comumente usada. A hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade da molécula pode constituir uma restrição à biodisponibilidade, sendo necessárias doses frequentes. Devido a esta alta

dosagem, efeitos colaterais, como náuseas, taquicardia e distúrbios alimentares, podem também surgir, gerando inconvenientes aos pacientes. Dessa forma, a investigação de sistemas nanoparticulados pode garantir a passagem pelo cérebro e proporcionar uma liberação controlada do fármaco, o que pode reduzir a frequência de administração e minimizar os efeitos colaterais (WILSON *et al.*, 2008).

Segundo GUZIOR *et al.* (2015), para a doença de Alzheimer, a terapia colinérgica é a mais utilizada. Este tratamento visa a melhorar a transmissão colinérgica cerebral, uma vez que o nível de acetilcolina (neurotransmissor decisivo no desempenho cognitivo) é reduzido em pacientes com a doença, seja por diminuição da produção ou pela excessiva destruição pela enzima acetilcolinesterase. A literatura descreve uma série de fármacos que podem ser utilizados no tratamento, como tacrina (WILSON *et al.*, 2010), rivastigmina (WILSON *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2010; GUZIOR *et al.*, 2015), galantamina, donepezil, memantina (GUZIOR *et al.*, 2015), derivados de quinolina (RONEY *et al.*, 2005; MAO e SCHIMMER, 2008) e curcumina (CHENG *et al.*, 2015).

A tacrina é um inibidor da colinesterase usada no tratamento da doença de Alzheimer em estágio moderado, tendo sido o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1993. Embora o exato mecanismo de ação do princípio ativo seja ainda desconhecido, postula-se que este exerce o efeito terapêutico por meio do aumento das funções colinérgicas. Assim, o efeito primário da tacrina é a inibição reversível da colinesterase, butirilcolina-esterase e acetilcolinesterase. O fármaco pode também bloquear os canais de potássio, o que aumenta a duração do potencial de ação e a liberação de acetilcolina a partir dos neurônios (WILSON *et al.*, 2010). No entanto, atualmente o uso da tacrina não é considerado seguro, por resultar em efeitos tóxicos para o fígado.

Em todo caso, a tacrina abriu caminho para a pesquisa de novas moléculas com a mesma ação farmacológica, porém com efeitos colaterais reduzidos. Rivastigmina, donepezil, galantamina e memantina são fármacos aprovados pela FDA para o tratamento da doença de Alzheimer. A rivastigmina é capaz de bloquear a butirilcolina-esterase, enquanto a galantamina modula os receptores de acetilcolina nicotínicos. O donepezil é um inibidor moderado da autoagregação de placas β -amilóides. A memantina é uma antagonista do receptor de ácido-metil-aspártico, que protege as células neuronais e reduz a toxicidade (GUZIOR *et al.*, 2015).

A rivastigmina, cuja estrutura química é mostrada na Figura 2.14, é o princípio ativo do medicamento comumente utilizado hoje para o tratamento da doença, tendo sido mostrado que o fármaco é capaz de melhorar ou manter as funções cognitivas dos pacientes (WILSON *et al.*, 2008).

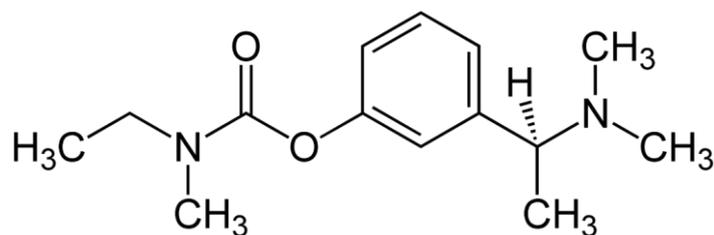


Figura 2.14: Estrutura química da rivastigmina.

O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), cuja estrutura química é apresentada na Figura 2.15, foi muito utilizado na década de 1950 como agente anti-parasitário oral para o tratamento e prevenção de amebíase intestinal. No entanto, em 1970 formulações de clioquinol oral foram retiradas do mercado devido a relatos de neurotoxicidade. Recentemente, estudos mostraram que o clioquinol apresenta atividade para a utilização no tratamento de câncer e da doença de Alzheimer (MAO e SCHIMMER, 2008).

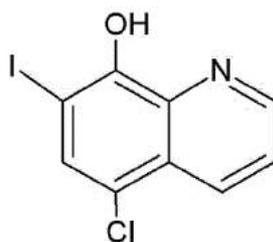


Figura 2.15: Estrutura química do clioquinol.

O clioquinol é um agente quelante de Cu / Zn e conhecido por solubilizar e inibir a acumulação das placas β -amilóides, associadas à doença de Alzheimer. Após a remoção do cobre, a agregação dessas proteínas é revertida (RONEY *et al.*, 2005). Um estudo clínico realizado por RITCHIE *et al.* (2003) demonstrou que o tratamento com clioquinol, além de bem tolerado, proporcionou redução dos níveis plasmáticos das placas β -amilóides e elevação dos níveis de zinco em indivíduos com a doença em fases moderadas e graves. Esses parâmetros podem ser associados a uma menor taxa de deterioração cognitiva. Agentes quelantes de metais, como o clioquinol, oferecem potencial terapêutico para o mal de Alzheimer. Na Tabela 2.1 são apresentadas as principais propriedades do clioquinol.

Tabela 2.1: Algumas propriedades do clioquinol.

Fórmula molecular	C ₉ H ₅ ClINO
Massa molar	305,5 g/mol
Cor	Pó amarelo
Ponto de fusão	178 °C
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água. Solúvel em clorofórmio e ácido acético.
Estabilidade	Escurece quando exposto a luz

Dados retirados de PubChem, 2015.

Em relação à toxicidade do fármaco, estudos de MAO e SCHIMMER (2008) conduzidos em animais e humanos mostraram que as doses indicadas para o tratamento do mal de Alzheimer, anteriormente descritas por RITCHIE *et al.* (2003), na faixa de 13 a 25 µmol/L na corrente sanguínea, não apresentaram toxicidade.

É importante enfatizar que o clioquinol apresenta características altamente lipofílicas, o que torna possível o seu encapsulamento *in situ* em nanopartículas poliméricas de PMMA.

A curcumina é um pigmento natural e principal componente ativo do açafrão-da índia. Este agente tem sido estudado nos últimos anos para o tratamento potencial de várias doenças, como o câncer, mal de Alzheimer e inflamações (TIWARI *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015). No caso específico para a doença de Alzheimer, a curcumina apresenta a capacidade de se ligar às placas β-amilóides, diminuindo a sua acumulação, além de permitir a localização destas placas no cérebro por técnicas de imagem por fluorescência, o que pode facilitar o diagnóstico da doença.

TIWARI *et al.* (2014) compararam a eficácia da curcumina como neuroprotetor quando encapsulada em nanopartículas de PLGA e em uma formulação livre. Na forma livre, a curcumina apresenta limitações em relação à biodisponibilidade, sendo rapidamente metabolizada. O sistema nanoparticulado possibilitou a liberação do ativo por 8 dias em ensaios *in vitro*.

CHENG *et al.* (2015) avaliaram o potencial de utilização da curcumina no diagnóstico do mal de Alzheimer por ressonância magnética, por meio da conjugação com nanopartículas magnéticas. As partículas produzidas apresentaram baixa toxicidade e capacidade de penetração na BHE em testes de permeabilidade *in vitro*.

Os resultados mostraram que a curcumina se liga às placas amilóides em cérebros de ratos, possibilitando a visualização para detecção da doença de Alzheimer.

2.7 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO E MODELOS CINÉTICOS

A liberação do fármaco encapsulado nas nanopartículas poliméricas pode ser avaliada por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os testes iniciais de liberação *in vitro* constituem um controle qualitativo do sistema e fornece informações para futuros estudos de liberação *in vivo* (BHARDWAJ e BURGESS, 2010).

Os testes de liberação *in vitro* desenvolvidos para sistemas nanoparticulados normalmente são adaptações dos aparatos recomendados pelas farmacopeias. Estes ensaios incluem separação por centrifugação, difusão por membrana de diálise e métodos de fluxo contínuo (RAWAT e BURGESS, 2011; GANDHI *et al.*, 2014). Durante os ensaios de liberação, é importante a manutenção da condição *sink*; ou seja, que o volume do meio de dissolução seja no mínimo três vezes maior que aquele necessário para obter uma solução saturada do fármaco (RAWAT e BURGESS, 2011).

No primeiro caso, as partículas com o fármaco são colocadas em um pequeno volume de meio em tubos e separadas por centrifugação a cada amostragem. No método de difusão, uma membrana de diálise é utilizada para separar a formulação e o meio de dissolução. As amostragens são então realizadas em intervalos de tempo determinados, sendo o meio de dissolução repostado. No entanto, podem-se citar limitações destes métodos, como violação das condições *sink*, agregação das partículas devido a agitação insuficiente e perdas durante a amostragem. Já o método de escoamento contínuo envolve a passagem do meio de dissolução através de uma célula que contém a formulação (RAWAT e BURGESS, 2011).

Muitas vezes a comparação dos resultados obtidos pelos testes de liberação é dificultada pela utilização de sistemas sem padronização de geometria e condições de operação. Em todo caso, os resultados podem ser utilizados para modelagem da cinética de liberação. A modelagem matemática dos sistemas de liberação e previsibilidade de disponibilização do fármaco constitui um campo de cada vez maior importância acadêmica e industrial e apresenta um enorme potencial futuro. Estes modelos visam a elucidar o comportamento do material e fornecer mecanismos de previsão da cinética de liberação (LAO *et al.*, 2011).

Os processos que ocorrem na maioria dos sistemas poliméricos de liberação englobam a difusão, a liberação por processo de ativação ou a erosão da matriz

polimérica. A grande maioria dos modelos teóricos baseia-se em equações de difusão. O fenômeno da difusão está intimamente ligado à estrutura do material através do qual o processo ocorre, sendo a morfologia dos polímeros levada em consideração no modelo. Inúmeras teorias matemáticas para descrever os sistemas de liberação de fármacos já foram apresentadas na literatura (MANADAS *et al.*, 2002; LAO *et al.*, 2011).

A difusão pode ser descrita como o movimento espontâneo e estocástico de moléculas de uma zona de elevada concentração para uma área de baixa concentração em um dado volume. Fick (1855-1995) realizou as primeiras análises deste fenômeno de transporte de massa, sendo seu trabalho reconhecido por duas equações fundamentais, as chamadas Leis de Fick da difusão (MANADAS *et al.*, 2002).

A Primeira Lei de Fick é usada para descrever a difusão em estado estacionário; isto é, quando a concentração não se altera em relação ao tempo, dependendo somente da posição. Para o caso unidimensional, a Lei de Fick pode ser escrita como apresentado pela Equação 2.1,

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2.1)$$

onde J é o fluxo difusivo (a quantidade de partículas do fármaco que passa através de uma unidade de área por unidade de tempo); C é a concentração da espécie, dependente apenas da posição; D é o coeficiente de difusão do fármaco, dependente da natureza do fármaco e do meio; e x é a posição normal ao plano central da membrana ou filme. O sinal negativo mostra que a difusão ocorre contra o gradiente de concentração. O coeficiente de difusão de um fármaco em um polímero pode ser influenciado por vários parâmetros como a densidade de reticulação, o grau de ramificação e o grau de cristalinidade do material (LAO *et al.*, 2011).

A Segunda Lei de Fick, representada pela Equação 2.2, é usada para descrever o sistema em estado transiente, quando a concentração varia não só com a posição, mas também com o tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

Todos os parâmetros da Equação 2.2 apresentam o mesmo significado apresentado na Equação 2.1, com exceção de C , que agora representa a concentração da espécie dependente do tempo e da posição.

Ambas as equações formaram a base de vários modelos de liberação de fármacos desenvolvidos nas últimas décadas. Em alguns casos, a equação do modelo é deduzida por meio da análise teórica do processo, como no caso da cinética de ordem zero. Na maioria dos casos, porém, não existe um fundamento teórico, sendo utilizada apenas uma equação empírica. Os modelos comumente utilizados para descrever os perfis de liberação são os de Higuchi e Peppas (MANADAS *et al.*, 2002; LAO *et al.*, 2011).

A cinética de ordem zero exibe um perfil considerado perfeito, uma vez que descreve a liberação de concentrações iguais de fármaco por unidade de tempo; ou seja, a taxa de liberação é constante e independente da concentração de fármaco (COSTA e LOBO, 2001). As formas farmacêuticas que seguem o perfil de primeira ordem geralmente são aquelas que contêm fármacos hidrossolúveis em matriz porosa. Este modelo caracteriza-se por apresentar a liberação do fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente em seu interior, de modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS *et al.*, 2002). A equação de Higuchi permite uma descrição simples para a liberação de fármacos a partir de um sistema em que o fármaco está disperso uniformemente por toda a matriz. O modelo admite estado estacionário ou pseudoestacionário, de forma que a primeira Lei de Fick pode ser aplicada. O modelo semi-empírico de Peppas é utilizado para descrever a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos. A equação pode ser traduzida como uma lei de potência, sendo útil para descrever vários mecanismos de transporte, incluindo a difusão Fickiana, o transporte não-Fickiano, bem como o comportamento de liberação de ordem zero. O mecanismo de transporte pode ser definido pelo valor do expoente n da equação. Para esferas, a difusão Fickiana é o mecanismo de transporte dominante quando n é igual a 0,43, enquanto que o transporte não-Fickiano é descrito por parâmetros na faixa entre 0,43 e 1. Quando n é igual a 1, a liberação de ordem zero é obtida (LAO *et al.*, 2011).

Apresentam-se na Tabela 2.2 as equações dos principais modelos utilizados para descrever a cinética de liberação. Deve-se notar que, em todas as equações descritas, Q representa a fração do fármaco liberada no tempo t e Q_0 representa a quantidade inicial de fármaco.

Tabela 2.2: Principais modelos de liberação.

Modelo	Equação	
Ordem zero	$Q = k_0 \cdot t + Q_0$	k_0 a constante cinética de ordem zero.
Primeira ordem	$Q = Q_0 \cdot e^{k_1 \cdot t}$	k_1 é a constante cinética de primeira ordem.
Higuchi	$Q = k_H \cdot \sqrt{t}$	k_H é a constante cinética de Higuchi, que descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na Lei de Fick.
Peppas	$Q = k_p \cdot t^n$	k_p é uma constante que combina as características geométricas e estruturais do sistema polímero / fármaco; e n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de transporte.

2.8 TOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

A toxicidade de sistemas nanométricos constitui uma área de grande interesse e importância, devido à expansão nas últimas décadas da utilização da nanotecnologia em aplicações biomédicas e farmacêuticas. Quando um material é reduzido à dimensão nanométrica, as propriedades podem ser drasticamente diferentes dos materiais originais, resultando em propriedades físicas e químicas únicas. Estas propriedades são inerentes não somente ao tamanho, mas também à morfologia e organização espacial destes materiais. Dessa forma, os perfis de toxicidade dos nanomateriais podem também ser diferentes, sendo que a avaliação envolve considerações físicas, químicas e moleculares (VEGA-VILLA *et al.*, 2008).

Devido ao tamanho característico, as nanopartículas apresentam uma grande área específica. Esta propriedade pode ser traduzida como um aumento da atividade biológica devido às diferentes possibilidades de interações com as células e seus componentes. Além disso, a estabilidade do sistema está condicionada a efeitos de aglomeração e coalescência (VEGA-VILLA *et al.*, 2008).

A trajetória das nanopartículas no organismo e o desencadeamento da resposta imune ainda não são muito bem conhecidos; porém, existe uma crescente preocupação com o papel destes materiais e possíveis reações alérgicas (BERTRAND e LEROUX, 2012).

BERTRAND e LEROUX (2012) sugerem um possível mecanismo para a circulação de carreadores de fármacos coloidais. Partindo de uma injeção periférica

intravenosa, o sistema é enviado diretamente para o coração através da circulação venosa. O sangue é liberado e segue para os pulmões. Algumas partículas podem ficar presas nos pulmões devido ao pequeno diâmetro dos capilares pulmonares. Após as partículas passarem pelos vasos capilares dos pulmões, são bombeadas pelo coração, alcançando a circulação sistêmica, chegando aos demais órgãos. Com base nos valores do fluxo sanguíneo em cada órgão proposto por DAVIES e MORRIS (1993), a concentração relativa de material que atinge o tecido pode ser estimada. Na Figura 2.16 é apresentado um esquema ilustrativo desse processo, bem como a concentração relativa do material que chega aos tecidos, após bombeamento pelo coração.

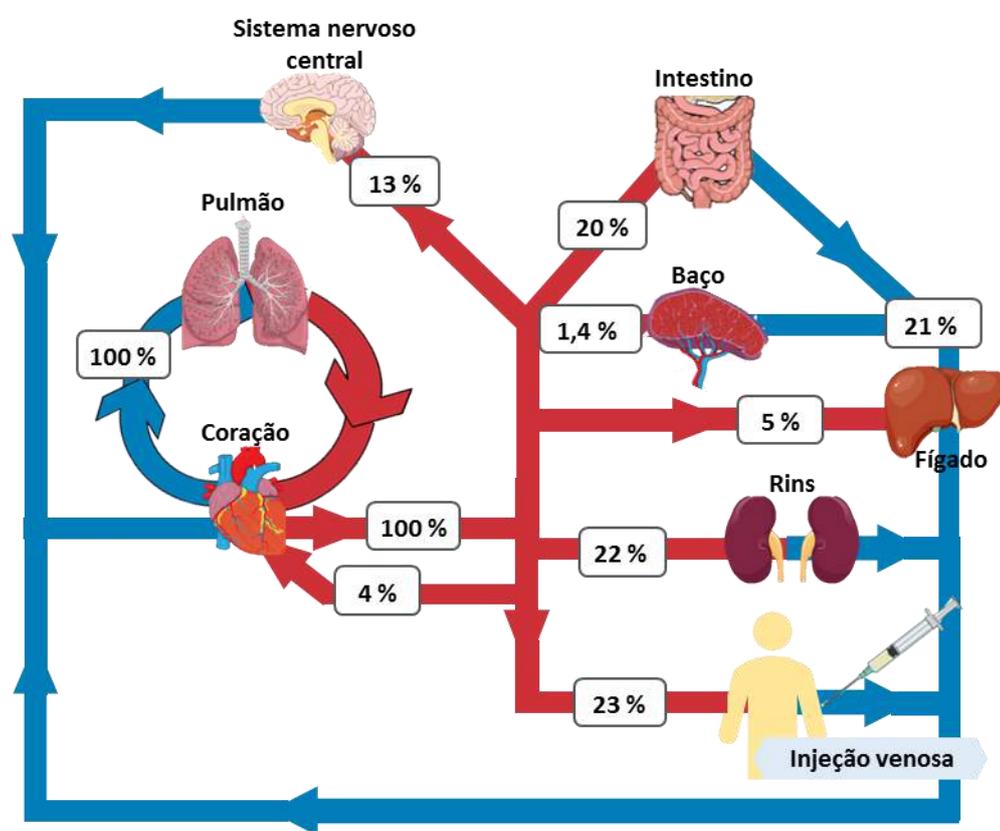


Figura 2.16: Esquema ilustrativo da distribuição do fluxo sanguíneo na circulação e valores da porcentagem relativa em cada órgão. Adaptada de BERTRAND e LEROUX (2012).

A literatura mostra que as nanopartículas podem causar inflamação, danos no DNA, destruição de membranas e produzir espécies reativas. A avaliação da toxicidade de nanopartículas pode ser realizada mediante estudos de viabilidade celular pelo ensaio MTT (brometo de tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil) tetrazolium) (VOIGT *et al.*, 2014). Este teste é baseado na medida do dano induzido pelo material em questão no metabolismo celular de glicídeos, por meio da avaliação da atividade de enzimas

desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT, de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (um sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) (ZACAN *et al.*, 2010).

Os estudos de toxicidade são fundamentais para estabelecer o potencial de utilização das nanopartículas *in vivo*. Dessa forma, compreender as propriedades físico-químicas e moleculares e os processos fisiológicos que envolvem as nanopartículas é imperativo para que o uso na área médica se estabeleça como uma modalidade de tratamento confiável e sustentável (VEGA-VILLA *et al.*, 2008).

VOIGT *et al.* (2014) realizaram estudos de toxicidade de nanopartículas de PBCA *in vitro* por meio do teste MTT e *in vivo*. Os resultados mostraram que as nanopartículas não induzem a morte neuronal em concentrações efetivas, mesmo quando revestidas com surfactantes, que são normalmente adversos à viabilidade de culturas celulares. Segundo GRAÇA *et al.* (2017), superfícies carregadas positivamente normalmente aumentam a citotoxicidade, quando comparadas as partículas com carga negativa ou neutra.

GRAÇA *et al.* (2017) reportaram que até a presente data, os estudos de toxicidade de nanopartículas de PMMA não mostraram efeito tóxico significativo, uma vez que não foram detectadas alterações de viabilidade, crescimento e atividade metabólica de células. O mesmo grupo realizou uma combinação de ensaios para verificar a possível toxicidade de nanopartículas de PMMA e PMMA-Eudragit. Os estudos mostraram que as partículas são internalizadas em linhagem de células de fibroblastos de ratos e não exibiram efeito tóxico relevante.

MENDES *et al.* (2017) mostraram, por meio de testes de citotoxicidade MTT e ensaios de azul de tripano que nanopartículas de PMMA produzidas via polimerização em miniemulsão, não causam efeitos de tóxicos em células leucêmicas. Já quando as nanopartículas que continham extratos de plantas com atividades antitumorais encapsulados foram capazes de aumentar a morte celular quando comparadas as amostras de PMMA puro.

2.9 NANOPARTÍCULAS NO MERCADO

Sistemas constituídos por nanopartículas vêm sendo estudados nos últimos anos com o objetivo de desenvolver inúmeras aplicações clínicas, como liberação de fármacos, novas formas de terapias, diagnóstico e implantes ativos. Como já discutido,

os sistemas baseados em nanopartículas oferecem vantagens em comparação aos demais, como a possibilidade de atingir e tratar áreas específicas do organismo. Atualmente já existem produtos contendo nanopartículas aprovados pelos órgãos reguladores no mercado e outras formulações em testes clínicos (ANCELMO e MITRAGOTRI, 2016).

De acordo com pesquisas recentes, o mercado global em nanomedicina correspondia a 248 bilhões de dólares em 2014, com projeção de crescimento para 2019, chegando a 528 bilhões de dólares. O principal campo de crescimento deste mercado é na área de sistemas de liberação de fármacos, aplicados principalmente ao tratamento de câncer, doenças relacionadas ao sistema nervoso central e cardiovascular e controle de infecções (BCC RESEARCH, 2015).

ANCELMO e MITRAGOTRI (2016) listaram os principais produtos que contêm nanopartículas, mostrados na Tabela 2.3, já foram aprovados, assim como outros que estão em fase de testes clínicos.

Tabela 2.3: Produtos baseados em nanopartículas e usados para terapia venosa no tratamento do câncer.

Nome	Tipo de partícula	Fármaco	Situação
Doxil (Janssen)	Lipossoma	Doxorrubicina	Aprovado FDA (1995)
Myocet (Teva UK)	Lipossoma	Doxorrubicina	Aprovado EMA (2000)
Marqibo (Spectrum)	Lipossoma	Vincristina	Aprovado FDA (2012)
Onivyde (Merrimack)	Lipossoma	Irinotecan	Aprovado FDA (2015)
Abraxane (Celgene)	Albumina conjugada	Paclitaxel	Aprovado FDA (2012)
BIND – 014 (BIND Therapeutics)	PLGA ou PLA	Docetaxel	Em teste (Fase II)
Cynviloq (Sorrento)	Micela polimérica	Paclitaxel	Em teste
Docetaxel (Samyang Biopharmaceuticals)	Micela	Docetaxel	Em teste (Fase II)

Adaptado de ANCELMO e MITRAGOTRI (2016).

O Doxil foi o primeiro “nanomedicamento” aprovado pelo FDA em 1995 e consiste de um sistema de lipossomas contendo doxorubicina para o tratamento de câncer. Logo após, surgiram outras formulações também baseadas em lipossomas, como Marqibo, Myocet e Onivyde. Para o tratamento de câncer, o único sistema nanométrico não lipossomal já aprovado é o Abraxane, um conjugado de proteína albumina e paclitaxel. Em relação às formulações em fase de testes, já são encontrados sistemas baseados em polímeros e micelas, como BIND, Cynviloq e Docetaxel, além dos lipossomas.

Para o desenvolvimento de um sistema de transporte de fármacos com nanopartículas, uma série de desafios deve ser enfrentada. Os principais desafios são relacionados aos aspectos biológicos, como o entendimento das interações entre estes materiais e o organismo, estudos intensos de biodistribuição e toxicidade. Além disso, outra questão bastante relevante diz respeito ao escalonamento dos processos de produção e viabilidade econômica, uma vez que a maioria dos sistemas descritos na literatura encontram-se em fase de estudos de bancada.

2.10 COMENTÁRIOS FINAIS

Neste capítulo foram apresentados alguns dos principais estudos desenvolvidos na área de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas poliméricas relacionados ao tratamento de doenças neurodegenerativas. Os objetivos deste texto incluíram a contextualização e justificação do presente trabalho, além de mostrar a experiência do grupo de pesquisa.

O número de pacientes portadores de doenças neurodegenerativas, como mal de Alzheimer e mal de Parkinson, tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido ao envelhecimento da população. Essas doenças geram grande sofrimento aos pacientes e familiares, além de elevados custos. Dessa forma, a busca de alternativas que permitam o tratamento e melhoria das condições de vida dos pacientes é imprescindível.

Como apresentado, o tratamento das doenças que atingem o sistema nervoso central está atrelado à capacidade de disponibilização de fármacos no cérebro. A entrega de fármacos, por sua vez, é condicionada à passagem pela barreira hematoencefálica, membrana de proteção do cérebro. Uma abordagem bastante promissora para o tratamento dessas doenças é a utilização de nanopartículas poliméricas funcionalizadas como veículo para o transporte de fármacos. Neste caso,

as nanopartículas poliméricas modificadas com biomoléculas conjugadas na superfície podem ser reconhecidas por receptores na membrana, permitindo a passagem através da barreira hematoencefálica.

Nessa pesquisa, os materiais base selecionados para o desenvolvimento do sistema de transporte de fármaco foram os polímeros acrílicos derivados dos monômeros MAA, AA e MAA, o fármaco clioquinol e o peptídeo TAT. Os polímeros escolhidos apresentam características comprovadas de biocompatibilidade, sendo amplamente utilizado na área biomédica. O clioquinol pode ser usado como um fármaco modelo para o tratamento de doenças neurodegenerativas, sendo já reportado em estudos clínicos. O peptídeo TAT é uma biomolécula de penetração celular, o que pode favorecer o transporte das nanopartículas através dos tecidos.

Capítulo III

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Para as reações de polimerização foram utilizados os seguintes reagentes:

- Monômero metacrilato de metila (MMA) com pureza mínima de 99,5%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Monômero ácido acrílico (AA) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Monômero ácido metacrílico (MAA) - Doação das Indústrias Químicas Taubaté (Taubaté, Brasil) IQT. Lote F09266;
- Surfactante brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Merck Millipore (São Paulo, Brasil);
- Persulfato de potássio (KPS) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado como iniciador nas reações de polimerização;
- Peróxido de benzoíla (PBO) com pureza mínima de 97%, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado como iniciador nas reações de polimerização;
- Azobisisobutironitrila (AIBN) fornecido pela Merck Millipore (São Paulo, Brasil) com 98,5% de pureza mínima e usado como iniciador nas reações polimerização;
- Bicarbonato de sódio P.A. com pureza mínima de 99,7%, fornecido pela Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado como agente de controle de pH;
- n-Hexadecano P.A. com pureza mínima de 99,5%, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado como co-estabilizador;

- Hidroquinona com pureza mínima de 99%, fornecida pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), utilizada como inibidor da reação de polimerização;
- 5-Cloro-7-iodo-8-quinolinol (Clioquinol) com pureza mínima de 95%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado com fármaco modelo para encapsulamento;
- Poli(ácido acrílico) com diâmetro de partícula <1000 µm e pureza mínima de 99%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetona P.A. com 99,5% de pureza mínima, fornecida pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), usada para limpeza de vidrarias e equipamentos;
- Etanol P.A. com 99,8% de pureza mínima, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado para limpeza de vidrarias e equipamentos.

Para os ensaios de adsorção foram utilizados os seguintes reagentes:

- 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) carbodiimida (EDC) com pureza mínima de 97%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado como agente de ativação de grupos ácidos;
- Proteína albumina de soro bovino (BSA) com 98% de pureza mínima, fornecida pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), usada como molécula modelo para adsorção;
- Aminoácido Lisina com 98% de pureza mínima, fornecida pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), usada como molécula modelo para adsorção;
- Peptídeo HIV-1 TAT (47-57), Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg, com 95% de pureza mínima, fornecido por Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Marcador de fluorescência 2-amino benzamida (2-Abz), com 98% de pureza, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Solução de Bradford: preparada em laboratório utilizando-se azul brilhante de coomassie com pureza mínima de 99,5 %, fornecido pela Sigma Aldrich(Rio de Janeiro, Brasil); etanol com pureza de 95% e ácido ortofosfórico com pureza de 85%, ambos fornecidos pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil); utilizada para ensaios de quantificação após adsorção.

- Reagente OPA: Solução completa de o-ftaldialdeído, na concentração de 1 mg/mL, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), usado em ensaios de quantificação após adsorção;
- Solução tampão Fosfato: preparada em laboratório utilizando-se fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico, ambos apresentando pureza mínima de 99% e fornecidos pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil); utilizada como meio de adsorção;
- Solução tampão Acetato: preparada em laboratório utilizando-se ácido acético glacial, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) e acetato de sódio anidro com pureza mínima de 99%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil); utilizada como meio de adsorção;
- Solução tampão Borato: preparada em laboratório utilizando-se tetraborato de sódio com pureza mínima de 99% e hidróxido de sódio com pureza mínima de 97%, fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil); utilizada nos ensaios de quantificação.

Nos ensaios de liberação e quantificação do fármaco foram usados os seguintes reagentes:

- Solução tampão Fosfato salino: preparada em laboratório utilizando-se fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico e cloreto de sódio, todos apresentando pureza mínima de 99% e fornecidos pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil); utilizada como meio de liberação;
- Surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil).

Nos experimentos *in vivo*, os seguintes reagentes foram utilizados:

- Solução tampão Fosfato salino: preparada em laboratório utilizando-se fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico e cloreto de sódio, todos apresentando pureza mínima de 99% e fornecidos pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);

- Paraformaldeído com pureza de 94% e fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Sacarose com pureza de 99,5% e fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Glicerol com pureza de 99% e fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil).

Nos ensaios *in vitro* foram utilizados:

- Meio de cultura de células DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 4,5 g/L de glicose fornecido por Gibco (Massachusetts, EUA);
- Soro fetal bovino fornecido por Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil).

Todos os experimentos foram realizados usando água ultrapura produzida no laboratório com o equipamento de filtração Master System MS 2000, Gehaka (São Paulo, Brasil). A não ser que seja explicitamente dito o contrário, todos os reagentes e solventes foram usados como recebido, sem purificação adicional.

3.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados nas reações de polimerização são discriminados abaixo.

- Balança analítica – Bel Engineering, Piracicaba, Brasil (modelo U210A);
- Sonicador – Sonics, Rio de Janeiro, Brasil (modelo Vibra Cell VCX 750) com potência máxima de 750 W;
- Homogeneizador de alta pressão – Artepeças, Taubaté, Brasil (modelo APLAB-10) com pressão máxima de 1000 bar;
- Mini-reator para polimerização – Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça (modelo Easy Max 102), com volume máximo de 100 mL, encamisado com controle automático de temperatura e equipado com termopar, agitador e condensador;
- Estufa com recirculação – Quimis, Diadema, Brasil.

Para os ensaios de funcionalização foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Espectrofotômetro UV-VIS – A & E Laboratory Instruments, São Paulo, Brasil (modelo UV 1803);
- Espectrofotômetro UV-VIS para microplacas – ThermoScientific, Massachusetts, EUA (modelo Multiskan GO);
- Agitador Roto-Shaker – Scientific Industries, Bohemia, EUA (modelo Roto-Shake Genie)
- Centrífuga – Termo Scientific, Massachusetts, EUA (modelo Megafuge 16R).

Para os ensaios de caracterização, liberação do fármaco e testes *in vivo* e *in vitro* foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Analisador de tamanho de partícula e potencial zeta – Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido (modelo ZetaSizer Nano ZS);
- Cromatógrafo de permeação em gel – Viscotek, Houston, EUA (modelo GPC Max VE 2001), equipado com detector refratométrico (modelo VE 3580) e conjunto de colunas lineares (Shodex – modelos KF-48804L e KF-805L) com tamanhos máximos de poro de $1,5 \times 10^3$ e 5×10^3 Å. Como fase móvel e para solubilização das amostras foi utilizado tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc (Fairfield, EUA);
- Analisador Termogravimétrico (TGA) – Perkin Elmer, Ohio, EUA (modelo STA-6000);
- Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) – Perkin Elmer, Ohio, EUA (modelo DSC 8500);
- Goniômetro – Dataphysics, Filderstadt, Germany (modelo OCA 20);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) – Fei Company, Oregon, EUA (modelo Quanta 200), com tensão máxima de 30 kV e utilizado em alto vácuo. As amostras foram metalizadas com o metalizador Jeol LTDA, Peabody, EUA (modelo JFC 1500).
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) – Jeol LTDA, Peabody, EUA (modelo JEM-2100F) operando a 200 kV, sendo a fonte de elétrons de emissão de campo (FEG) e equipado com câmera CCD (11 Mpixel GATAN Orius);
- Microscópio Vertical – Nikon, São Paulo, Brasil (modelo Eclipse Ci);

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – Varian Mercury, Califórnia, EUA (modelo VX300);
- Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA (modelo Nicolet 6700), equipado com acessório Smart Orbit que permite análise direta do material;
- Cromatógrafo de Alta Eficiência (HPLC) – Agilent Technologies, Santa Clara, EUA (modelo Agilent 1200), e coluna Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m). Como fase móvel foi utilizada acetonitrila (ACN) grau HPLC, fornecida pela Tedia Company Inc. (Fairfield, EUA) e água ultra pura;
- Espectrofotômetro de fluorescência – JASCO Inc., Easton, EUA (modelo FP8200);
- Homogeneizador de pequenas amostras – Ultra Stirrer, São Paulo, Brasil (ULTRA80-I).
- Sistema *Transwell* – membranas de poliéster (PET) para cultura celular com poro de 0,4 μ m e área superficial para crescimento de 0,33 cm² – Corning Inc, Nova York, EUA.
- Leitor de microplacas – Molecular Devices, Califórnia, EUA (modelo SpectraMax Plus 384).

3.3 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Neste trabalho, explorou-se a técnica de produção de nanopartículas por polimerização em miniemulsão, conforme metodologia descrita a seguir, sendo avaliados os polímeros derivados dos monômeros metacrilato de metila (MMA), ácido acrílico (AA) e ácido metacrílico (MAA).

3.3.1 Reação de polimerização em miniemulsão

As nanopartículas de PMMA e de copolímeros de P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA) foram preparadas por meio de reações de polimerização em miniemulsão. Um esquema da unidade experimental utilizada para as reações é apresentado na Figura 3.1.

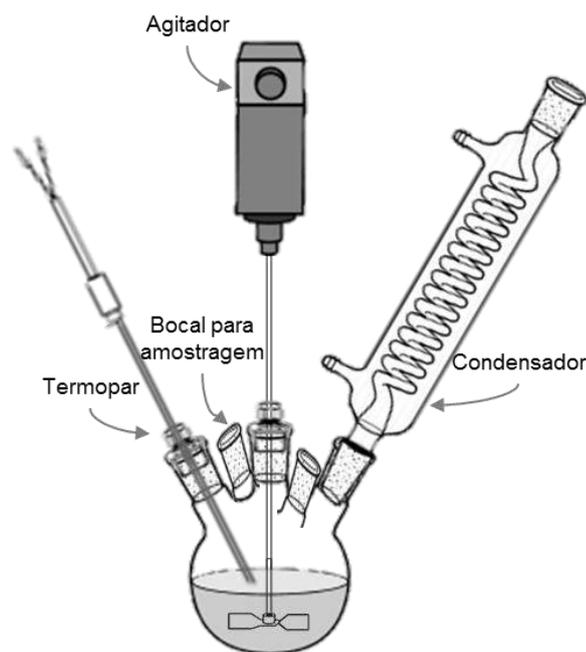


Figura 3.1: Esquema do mini-reator de polimerização utilizado nos experimentos.

O procedimento experimental foi desenvolvido conforme descrito por LANDFESTER (2009) e PEIXOTO (2013). Primeiramente, foi preparada a fase aquosa composta pelo surfactante, água e bicarbonato de sódio, usado para correção do pH (valores de pH em torno de 6,0). Esta mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos para homogeneização. Em seguida, a fase orgânica composta pelo monômero e hexadecano, utilizado como co-estabilizante, foi adicionada à fase aquosa, formando uma pré-emulsão, e também homogeneizada por agitação magnética por 5 minutos. Quando o iniciador hidrossolúvel persulfato de potássio (KPS) foi utilizado, uma parte da carga de água (3 mL) foi separada para sua dissolução. No caso da utilização do iniciador organossolúvel peróxido de benzoíla (PBO), este foi adicionado à fase orgânica da receita experimental.

A pré-emulsão foi levada ao sonicador para uma melhor dispersão, utilizando frequência central de 20 kHz com amplitude de 20% também por 5 min. A técnica de ultrassom foi utilizada com o intuito de reduzir o tamanho das gotas. Para atenuar o efeito de aumento da temperatura do sistema durante a dispersão por ultrassom, foi utilizado um banho com gelo.

Avaliou-se também a utilização do homogeneizador de alta pressão para a dispersão da pré-emulsão. Nestes casos, a pré-emulsão foi tratada com uma pressão de 100 bar por 20 min a uma vazão de 10 L/h. Como descrito por ASUA (2002), o

homogeneizador de alta pressão é capaz de produzir partículas com diâmetro menor que aquelas obtidas com o sonicador. Além disso, obtém-se uma distribuição mais uniforme dos tamanhos de partícula. O desenvolvimento de um procedimento em miniemulsão para a produção de nanopartículas utilizando o homogeneizador de alta pressão facilita ainda o posterior escalonamento do processo.

O reator foi então carregado com a emulsão preparada e as reações foram conduzidas na temperatura constante de 80°C, sob agitação de 500 rpm por 2 horas.

3.3.2 Avaliação do surfactante na produção das nanopartículas

Inicialmente, foi desenvolvido um planejamento experimental para avaliação do efeito do surfactante sobre a produção das nanopartículas. As seguintes variáveis foram investigadas: tipo e concentração de surfactante, em uma faixa de 1 a 5% (m/m) em relação ao monômero; e razão entre as fases orgânica e aquosa (O/A), variada entre 15 e 25%. Foram avaliados os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), aniônico, e brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), catiônico. Foram escolhidos os surfactantes modelos SDS e CTAB como forma de avaliar as diferentes cargas fornecidas por cada um deles e seu efeito no polímero final produzido. Não foram testados, no entanto, surfactantes não-iônicos. No APÊNDICE A são apresentados os cálculos das concentrações de surfactantes avaliadas e a possibilidade de formação de micelas, de acordo com cada condição experimental.

Nos experimentos correspondentes à razão O/A de 15% e 25%, a massa da fase aquosa foi mantida em 64 g. Para aqueles situados no ponto médio do planejamento, com razão O/A de 20%, utilizou-se 80 g de fase aquosa. Deve-se notar ainda que a massa de hexadecano, bicarbonato de sódio e iniciador foram mantidas constantes em todas as condições experimentais. A Tabela 3.1 apresenta as massas dos reagentes utilizados na receita experimental.

Assim, foi conduzido um planejamento experimental 2^3 , com triplicata nos pontos centrais, sendo executados 14 experimentos. As variáveis foram normalizadas na faixa de -1 (menor valor), 0 (ponto central) e +1 (maior valor). Como variáveis resposta, foram avaliados o tamanho médio das partículas e o potencial zeta. Neste primeiro conjunto de reações, utilizou-se o sonicador como meio de dispersão.

Tabela 3.1: Receita experimental das reações de polimerização para as diferentes condições avaliadas.

	Reagente	Massa (g)			
		25%	20%	15%	
Fase orgânica	Monômero	16	16	9,6	
	Hexadecano	0,064	0,064	0,064	
Fase aquosa	Água	64	80	64	
	Surfactante	1%	0,16	0,16	0,096
		3%	0,48	0,48	0,288
		5%	0,8	0,8	0,48
	Bicarbonato de sódio	0,064	0,064	0,064	
Iniciador	0,08	0,08	0,08		

3.3.3 Reações de copolimerização com ácido acrílico e ácido metacrílico

A copolimerização do MMA com AA ou MAA foi investigada com o intuito de inserir grupos ácidos carboxílicos nas partículas. Os grupos ácidos presentes foram posteriormente utilizados para imobilização da biomolécula via reação química ou adsorção física. Nas reações de copolimerização, apenas o surfactante SDS foi utilizado, nas concentrações de 1% e 5% em relação ao monômero, de acordo com procedimento anteriormente descrito. Além disso, avaliou-se o uso dos iniciadores da reação KPS e PBO. Como meio de dispersão, utilizou-se o homogeneizador de alta pressão para as reações com KPS e o sonicador para as reações conduzidas com PBO. Foi necessária esta distinção visto o risco de ocorrer polimerização dentro do homogeneizador de alta pressão quando utilizado o iniciador solúvel na fase orgânica. Assim, o iniciador PBO foi adicionado antes da formação da miniemulsão. O AA foi adicionado na proporção de 7% e 15% da fase orgânica, conforme sugerido no trabalho anterior de PEIXOTO (2013). Já o MAA foi utilizado somente na concentração de 15% em relação a fase orgânica. Toda a carga de AA ou de MAA foi adicionada na fase de preparo da pré-emulsão.

3.3.4 Encapsulamento do fármaco clioquinol

A inserção do fármaco clioquinol, utilizado como modelo para o encapsulamento nas nanopartículas de P(MMA-co-AA) ou de P(MMA-co-MAA) produzidas, foi avaliada. Para alcançar uma alta eficiência de encapsulamento pela polimerização em miniemulsão e encapsulamento *in situ*, é necessário que o agente apresente boa solubilidade na fase orgânica.

Em temperatura ambiente, o clioquinol foi introduzido na fase orgânica na concentração de 1% (m/m) em relação ao monômero. Concentrações mais altas não foram passíveis de solubilização nesta temperatura.

Observou-se que o aumento da temperatura favorecia a solubilidade do clioquinol, sendo avaliada a possibilidade de inserção de maior quantidade do fármaco (até 5% (m/m)) no meio reacional por meio de ensaios de polimerização em massa. Os ensaios de polimerização em massa permitem estudar a cinética da reação de forma mais simples, já que o meio reacional é composto apenas pelo monômero e o iniciador. Posteriormente, essas reações foram realizadas também por polimerização em miniemulsão.

Os testes de polimerização em massa foram realizados em tubos de ensaio contendo concentrações de 1 a 5% (m/m) de clioquinol, sendo avaliados os iniciadores peróxido de benzoíla (PBO) e Azobisisobutironitrila (AIBN). Neste caso, somente foi possível a utilização de iniciadores organossolúveis. O iniciador foi adicionado no meio reacional após completa solubilização do fármaco nos monômeros na temperatura de reação de 80° C.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS

Os materiais produzidos foram caracterizados em relação ao tamanho de partícula, potencial zeta, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), medidas de ângulo de contato, análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e eficiência de encapsulamento. Além disso, avaliaram-se os produtos obtidos nas reações de polimerização em termos de conversão e das distribuições de massas molares. Realizaram-se também imagens das amostras obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.4.1 Potencial zeta e tamanho das partículas

Quase todos os materiais macroscópicos ou particulados em contato com um líquido adquirem carga elétrica na superfície. A carga pode aparecer pela solubilização preferencial de íons de um material cristalino, pela presença de grupos funcionais que podem dissociar-se ou pela adsorção de íons específicos na superfície da partícula.

O potencial zeta pode ser influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O potencial zeta não pode ser medido diretamente, sendo a técnica de eletroforese muito utilizada. Neste caso, o potencial é calculado por meio do rastreamento do movimento de partículas carregadas em um campo de tensão. Assim, a interação das partículas se dá pela magnitude do potencial zeta e não por sua carga de superfície (BUTT *et al.*, 2003).

A análise de resultados de potencial zeta pode ser utilizada para inferir a respeito da estabilidade do sistema. Valores altos de potencial zeta, isto é, superiores em módulo a 30 mV, indicam que as partículas tendem a se repelir, garantindo maior estabilidade da dispersão. Já nos casos em que o potencial zeta apresenta valores baixos há tendência de ocorrer instabilidade na dispersão, visto que as partículas tendem a se aproximar umas das outras até a agregação.

O espalhamento dinâmico da luz pode ser aplicado para a avaliação de sistemas particulados, emulsões e moléculas em meios dispersos (NIST, 2015).

Para as análises, as amostras foram diluídas em água e colocadas em cubetas específicas para avaliação do potencial zeta ou do tamanho, visto que as medidas são obtidas no mesmo equipamento. O pH das suspensões de nanopartículas em água era igual a 6,0. Para as medidas de tamanho, adicionaram-se uma ou duas gotas da amostra e completou-se o volume da cubeta com água, até obter uma suspensão translúcida. A diluição das amostras é necessária para evitar a possibilidade de espalhamento múltiplo. No caso das medidas de potencial zeta, as amostras foram diluídas em água destilada em uma razão de 1/500 e o pH do sistema encontrava-se em torno de 6,0. As medidas foram realizadas somente nesta condição de pH. O sistema foi deixado em equilíbrio por 1 minuto antes de cada medida. Os resultados foram calculados com base na equação de Smoluchowski (BUTT *et al.*, 2003) e apresentados como uma média de três medidas.

3.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A técnica de espectroscopia baseia-se nas interações da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode interagir com a matéria a partir dos processos de absorção, emissão e espalhamento (PAVIA *et al.*, 2009). As análises de infravermelho foram realizadas na região do infravermelho médio (4000- 400 cm^{-1}) em modo de reflexão total e com resolução de 4 cm^{-1} , com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes nas amostras sintetizadas e após processo de funcionalização pela conjugação química de biomoléculas. Cada espectro foi registrado como resultado da média de 128 *scans*. Para as análises de FTIR, as amostras do látex foram previamente secas em estufa de recirculação em temperatura de 30 °C, até atingirem massa constante.

3.4.3 Ressonância magnética nuclear

A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma importante técnica para a investigação e caracterização de diversos compostos a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. A técnica baseia-se no estudo da interação da radiação eletromagnética com os núcleos atômicos das moléculas (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; PAVIA *et al.*, 2009).

A incorporação do AA e do MAA na copolimerização foi verificada por análises de RMN, conduzidas com frequência de 300 MHz para H-RMN e 75 MHz para C-RMN, em sonda de 5 mm, utilizando como solvente clorofórmio deuterado e em temperatura de 40 °C. Análises para verificar a conjugação de biomoléculas à superfície das partículas foram também realizadas, nas mesmas condições descritas.

3.4.4 Medidas de ângulo de contato e tensão interfacial

A interação entre uma superfície e um líquido pode ser estudada por meio da medida do ângulo de contato e da tensão interfacial.

O ângulo de contato é definido como o ângulo formado entre um plano tangente a uma gota do líquido depositada na superfície de trabalho. A utilização de água para obtenção da gota permite inferir a respeito da hidroflicidade do material, sendo que quanto menor é o ângulo medido, mais hidrofílica é a superfície (BUTT *et al.*, 2003). Já

a tensão interfacial avalia a interação entre os componentes de cada fase, pela medida da força necessária para aumentar a área de superfície na interface.

As medidas de ângulo de contato foram realizadas com o objetivo de inferir a respeito da incorporação dos comonômeros AA e MAA, a partir do aumento da hidrofiliabilidade das partículas. Para estas medidas, utilizou-se água como líquido de trabalho e uma pequena porção do látex produzido após seco em estufa de recirculação a 30 °C até massa constante, na forma de um fino filme de partículas.

A avaliação da tensão interfacial permitiu inferir a respeito da estabilidade dos sistemas formados, com a utilização de surfactantes e pela adição do fármaco, pela verificação da diminuição dos valores de tensão interfacial e se o fármaco, de alguma forma, atua como um agente de superfície. O método utilizado para medidas da tensão interfacial foi o da gota pendente, com o auxílio de uma agulha em J. A gota era composta pela fase orgânica do sistema de polimerização; ou seja, pelos monômeros e na presença e ausência de fármaco. Foram realizadas medidas de tensão interfacial ao longo do tempo em temperatura ambiente e a 70 °C.

3.4.5 Análises térmicas

Os resultados da análise térmica fornecem dados para a identificação de alterações na conformação e no empacotamento das cadeias poliméricas em função das modificações químicas sofridas durante o processo de polimerização ou encapsulamento de ativos (SCHAFFAZICK *et al*, 2003). Testes de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizados para determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos materiais produzidos, com o objetivo de inferir a respeito das mudanças conformacionais do polímero em função dos teores de fármaco e comonômero usados nas reações. Nestes ensaios, cerca de 10 mg da amostra foram aquecidos de 25 a 200°C, a uma taxa de 10 °C/min, sob atmosfera de N_2 e resfriados até 10 °C a 100°C/min, para remover a história térmica do polímero. Logo depois, procedeu-se uma nova etapa de aquecimento de 25 a 200°C, a 10 °C/min, sob atmosfera de N_2 a 30 mL/min. A T_g do material foi obtida a partir da curva de DSC do segundo aquecimento.

Avaliou-se também a possível interação química entre o fármaco e o polímero por DSC. Neste caso, realizou-se apenas um aquecimento da amostra, na faixa de 25 a 200 °C, também a 10 °C/min e sob atmosfera de N_2 .

Análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas com o objetivo de determinar a temperatura característica de degradação das amostras produzidas. Realizou-se também uma avaliação do fármaco clioquinol. Os testes foram realizados na faixa de 50 a 700 °C, a 10 °C/min e conduzidos sob atmosfera de nitrogênio a 20 mL/min.

3.4.5 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas com o objetivo de visualizar a morfologia das nanopartículas e inferir a respeito da estrutura das amostras. No caso de análises que envolvem materiais sensíveis ao feixe eletrônico, como polímeros, as amostras devem ser previamente metalizadas (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

Para as análises de MEV, os látices produzidos foram previamente secos em capela por 24 horas e a amostra recolhida foi recoberta por uma fina camada de ouro sob uma taxa de deposição de 50 nm/min e tamanho de partícula de 5 nm. O ensaio foi realizado no Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM) do PEQ/COPPE/UFRJ.

3.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) é também uma técnica de imagem muito utilizada para caracterização de nanomateriais. Por meio desta técnica são obtidas imagens em alta resolução em nível de dimensões nanométricas e informações químicas a respeito do material. As imagens de MET permitem inclusive a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para as análises de MET, uma gota do látex foi dispersada em 25 mL de água destilada, sendo esta suspensão depositada em uma grade de cobre recoberta com carbono. A evaporação da água na amostra foi realizada em condições ambiente. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

3.4.7 Conversão

A avaliação da conversão de monômero na reação de polimerização foi realizada por gravimetria. Para tal análise, alíquotas do meio reacional foram retiradas em intervalos de tempos estabelecidos e suas massas aferidas após a adição de cinco gotas de solução de hidroquinona 1% (m/m). A solução de hidroquinona é utilizada como inibidor da reação. As amostras foram transferidas para estufa com recirculação a 30 °C para secagem e posterior medida da massa de polímero formado. A técnica gravimétrica consiste em estimar a conversão como a razão entre a massa de polímero seco obtido e a massa de monômero inicial na amostra, de acordo com a Equação 3.1.

$$X_p = \frac{M_{pol\ seco+cápsula} - (M_{cápsula} + M_{hidroquinona})}{\varphi_{orgânica} \cdot M_{látex}} \quad (3.1)$$

Sendo X_p a conversão, $M_{pol\ seco+cápsula}$ a massa de polímero seco e da cápsula, $M_{cápsula}$ a massa da cápsula somente, $M_{hidroquinona}$ a massa de hidroquinona adicionada, $\varphi_{orgânica}$ a fração mássica de fase orgânica e $M_{látex}$ a massa de amostra retirada do sistema.

3.4.8 Massa molar

Foram realizadas análises de GPC das amostras produzidas para determinação da massa molar final e também durante as reações, de modo a acompanhar a evolução da polimerização. O equipamento foi calibrado com padrões de poliestireno com massas molares na faixa de 5×10^3 a 1×10^6 Da. Para cada corrida, cerca de 3 mg de amostra foram solubilizadas em 3 mL de solvente tetrahidrofurano (THF). As análises foram realizadas em temperatura de 40 °C, utilizando o solvente THF como fase móvel, mantido na vazão constante de 1,0 mL/min.

3.4.9 Eficiência de encapsulamento

A determinação da quantidade de fármaco associada a sistemas de nanopartículas é dificultada pelo tamanho reduzido das partículas, de forma que a

separação da fração de fármaco livre da fração associada requer o uso de técnicas específicas. Segundo SCHAFFAZICK *et al.* (2003), uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, em que a concentração de fármaco livre presente na suspensão é determinada no sobrenadante após a centrifugação. A concentração total de fármaco associada às nanoestruturas é calculada como a diferença entre a fração livre e a carga total. Uma segunda técnica empregada refere-se à separação da fração livre de fármaco por meio de membranas, sendo a concentração de fármaco encapsulada calculada também por meio da diferença entre a fração livre e a carga total.

Em uma outra abordagem possível, a fração de fármaco encapsulada pode ser obtida a partir da extração em amostras secas por um solvente adequado. Neste caso, o solvente utilizado deve ser capaz de solubilizar o fármaco em detrimento do polímero. A eficiência pode ser calculada como a relação entre a concentração real das amostras após a extração e a concentração teórica de fármaco presente na amostra seca.

Diversos fatores podem influenciar na eficiência de encapsulamento nestes sistemas, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco utilizado, o pH do meio, a natureza do polímero e as características da superfície das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

No presente trabalho, a eficiência de encapsulamento foi avaliada pela técnica de separação por filtração/centrifugação com o auxílio de uma membrana 3 kDa (AMICON Ultra-15 3 K – Millipore, Massachusetts, EUA) e também pela extração do fármaco em etanol. No primeiro caso, uma amostra do látex produzido foi diretamente filtrada na membrana, possibilitando a separação das nanopartículas. Para a extração, preparou-se uma suspensão de nanopartículas em etanol, a partir de uma amostra previamente seca. A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 20 min e filtrada em membrana de 0,22 μm para completa separação dos sólidos.

Em ambos os casos, a concentração de fármaco foi determinada por análises em espectrofotômetro UV-VIS, após determinação do comprimento de onda de absorção máxima do fármaco e a partir de uma curva de calibração. O comprimento de onda de absorção máxima do fármaco foi determinado a partir de uma varredura no intervalo de 230 a 1000 nm, usando o solvente etanol para a extração. No caso da técnica de filtração/centrifugação, o comprimento de onda foi definido utilizando uma solução aquosa com surfactante em concentração igual à da receita experimental. A curva de calibração foi construída na faixa de concentrações de fármaco entre 0,01 e 0,1 g/L. Na Figura 3.2 é apresentado um esquema ilustrativo das técnicas utilizadas.

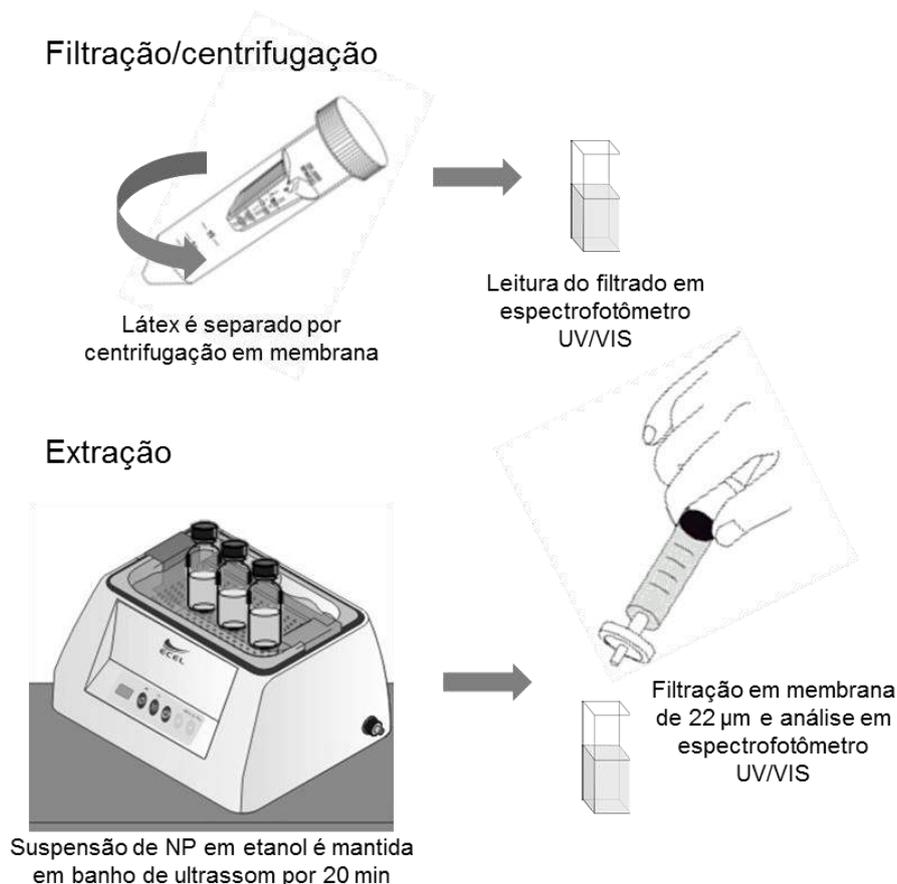


Figura 3.2: Representação das técnicas para determinação da eficiência de encapsulamento do fármaco.

3.5 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A inserção de um ligante específico à superfície das nanopartículas foi realizada com o objetivo de permitir o reconhecimento e passagem das nanopartículas pelas células da BHE, atingindo o alvo de liberação do fármaco.

A metodologia experimental foi implementada de acordo com o protocolo de imobilização de proteínas descrito por HERMANSON *et al.* (1992), com o auxílio de uma rota química que faz uso de 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) carbodiimida (EDC). A metodologia de imobilização com carbodiimida é normalmente aplicada quando o ligante apresenta resíduos de lisina ou arginina; ou seja, grupos amino livres e o suporte apresenta grupos ácidos. O EDC permite o acoplamento de proteínas ou peptídeos à superfície da partícula pela formação de uma ligação amida entre um grupo ácido e um grupo amino, sendo dessa forma utilizado como um agente de ativação.

As nanopartículas utilizadas nestes ensaios já continham o grupo ácido, inserido por meio da copolimerização com monômeros ácidos específicos. Para a reação de ativação com EDC ocorrer, os grupos ácidos devem estar livres na superfície das partículas. Avaliou-se também a imobilização do ligante nas nanopartículas de PMMA, de modo a verificar a eficiência da inserção do grupo ácido pela copolimerização e sua aptidão para a funcionalização. Para os testes iniciais de funcionalização, foram utilizadas a proteína albumina de soro bovina (BSA) e o aminoácido lisina (LYS) como moléculas modelos. A BSA é uma proteína amplamente utilizada como modelo em trabalhos de adsorção, além de apresentar bom desempenho como sinalizador em sistemas de liberação *in situ* (GELAMO *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005). Já a LYS é um aminoácido encontrado em várias proteínas e peptídeos de interesse.

A dosagem de proteínas e peptídeos imobilizados nas partículas foi realizada por meio do ensaio de BRADFORD (BRADFORD, 1976) para os testes com BSA e pelo ensaio com o reagente o-ftaldialdeído (OPA) (VIGO *et al.*, 1992) para os testes com lisina. A técnica de dosagem de proteínas por BRADFORD baseia-se na formação de um complexo entre o corante aniônico azul de cromassie e grupos básicos ou aromáticos presentes nos aminoácidos da proteína. Esta interação desloca o comprimento de onda de absorbância máxima do corante de 465 nm, na forma livre, para 595 nm, na forma complexada. O reagente OPA é utilizado normalmente como agente de derivação (método que permite a diminuição do limite de detecção) em análises cromatográficas a partir da reação com aminas primárias e aminoácidos, sendo estes detectados usualmente por fluorescência a 340 nm. No entanto, o reagente pode também ser utilizado para a dosagem via espectrofotometria UV-VIS em 340 nm.

O procedimento experimental utilizado nos dois ensaios encontra-se descrito no APÊNDICE B. Para o ensaio de funcionalização, as amostras que já continham o grupo ácido foram ativadas com solução de EDC 0,05 mol/L preparada em tampão fosfato (pH = 6,8). Esta reação foi mantida sob rotação de 20 rpm por 2 horas em temperatura ambiente. Após a ativação, o produto obtido foi filtrado em membrana de 100 kDa (AMICON Ultra-15 100 K, Millipore) a 6000 rpm por 20 min. O produto intermediário foi utilizado para imobilização do ligante. A reação de imobilização foi também acompanhada por 2 horas sob rotação de 20 rpm, na temperatura ambiente, sendo que o produto final obtido foi separado nas mesmas condições anteriores.

Apresenta-se na Figura 3.3 um esquema do procedimento experimental adotado para a funcionalização das partículas.

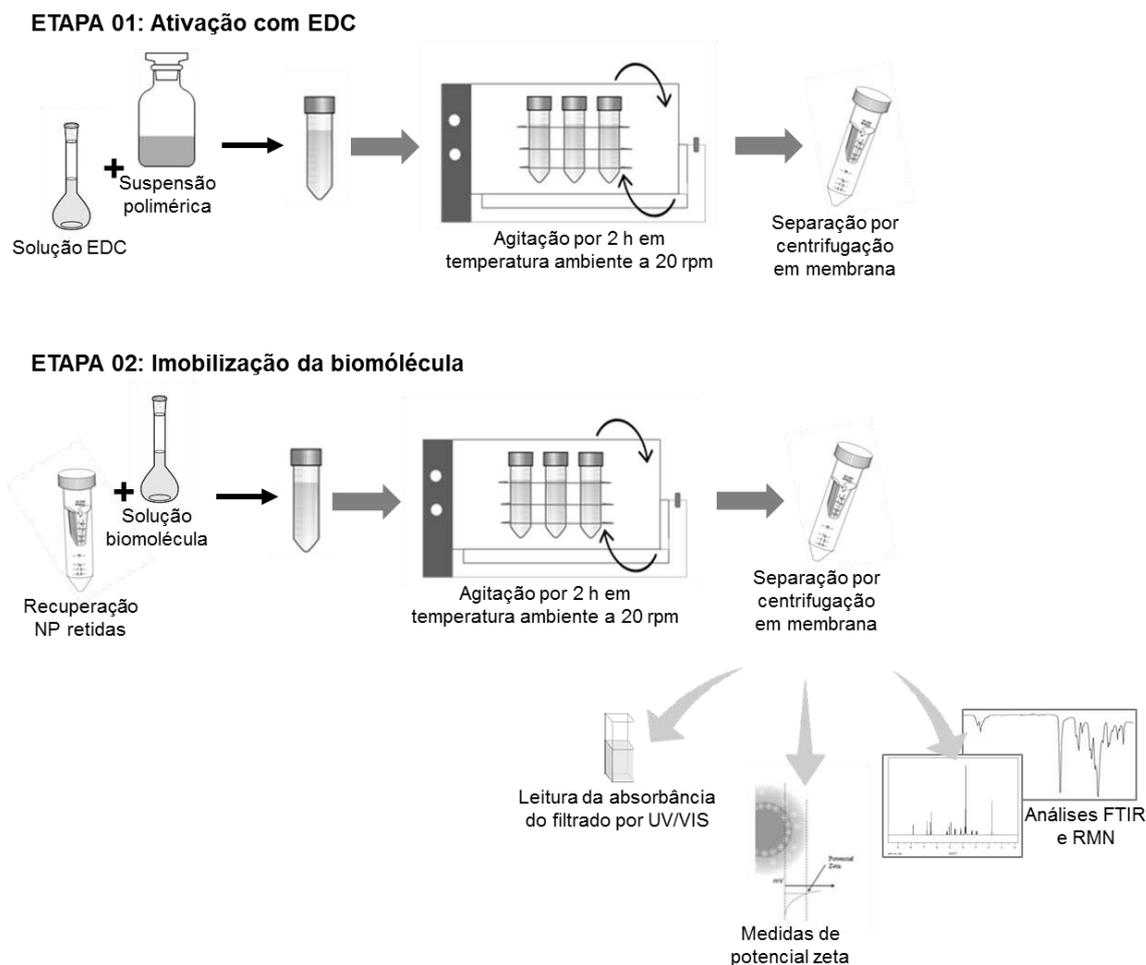


Figura 3.3: Esquema do procedimento experimental adotado para imobilização da biomolécula.

A quantificação do ligante imobilizado foi feita por meio de um balanço de massa após dosagem da biomolécula livre no filtrado pelo ensaio de BRADFORD (BRADFORD, 1976) ou pelo reagente OPA (VIGO *et al.*, 1992). Com o objetivo de verificar a formação da ligação química após o ensaio de funcionalização, realizam-se análises de FTIR e RMN após secagem das amostras em estufa de recirculação. Os ensaios foram conduzidos sob as mesmas condições já descritas. Além disso, avaliou-se o potencial zeta das partículas finais, como forma de inferir a respeito de alterações ocorridas na superfície.

Após definição das condições experimentais e viabilização da metodologia de funcionalização utilizando as moléculas modelo, foram iniciados os estudos de imobilização com o peptídeo TAT. O peptídeo TAT é uma molécula de penetração celular e foi selecionado como biomolécula para o transporte dirigido das partículas, visto os trabalhos descritos na literatura que mostram a eficiência em penetrar membranas (RAO *et al.*, 2008; CIOBANASU *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2012) Os ensaios

com o peptídeo TAT foram conduzidos nas mesmas condições já descritas e a dosagem do ligante imobilizado foi realizada pelo ensaio de BRADFORD.

A metodologia de funcionalização foi também aplicada para inserir um marcador de fluorescência nos sistemas preparados, com o objetivo de utilização posterior para detecção nos ensaios *in vivo*. O marcador 2-amino benzamida (2-Abz), cuja estrutura química é apresentada na Figura 3.4, foi ligado às nanopartículas em conjunto com o peptídeo TAT. É importante notar que o marcador escolhido possui grupos amina, usados para a conjugação às nanopartículas, de acordo com o princípio da metodologia de funcionalização adotada. Neste caso, o marcador e o peptídeo TAT foram incluídos na segunda etapa do protocolo apresentado na Figura 3.3. A molécula de 2-Abz apresenta comprimento de onda máximo de excitação em 320 nm e emissão em 420 nm.

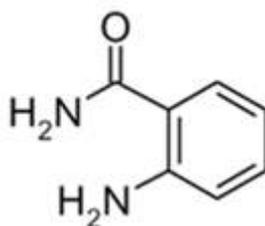


Figura 3.4: Estrutura química do marcador de fluorescência 2-amino benzamida.

3.6 TESTES DE LIBERAÇÃO

Os estudos do perfil de liberação do fármaco *in vitro* foram realizados com o objetivo de avaliar a quantidade de fármaco liberado e inferir sobre a sua cinética de liberação. Iniciaram-se os testes de liberação do fármaco utilizando como meio de liberação uma solução tampão fosfato salino (PBS) em pH = 7,4. Os testes foram conduzidos a partir de diferentes sistemas, utilizando membrana de diálise ou colocando o látex diretamente em contato com o meio de liberação, como mostrado na Figura 3.5.

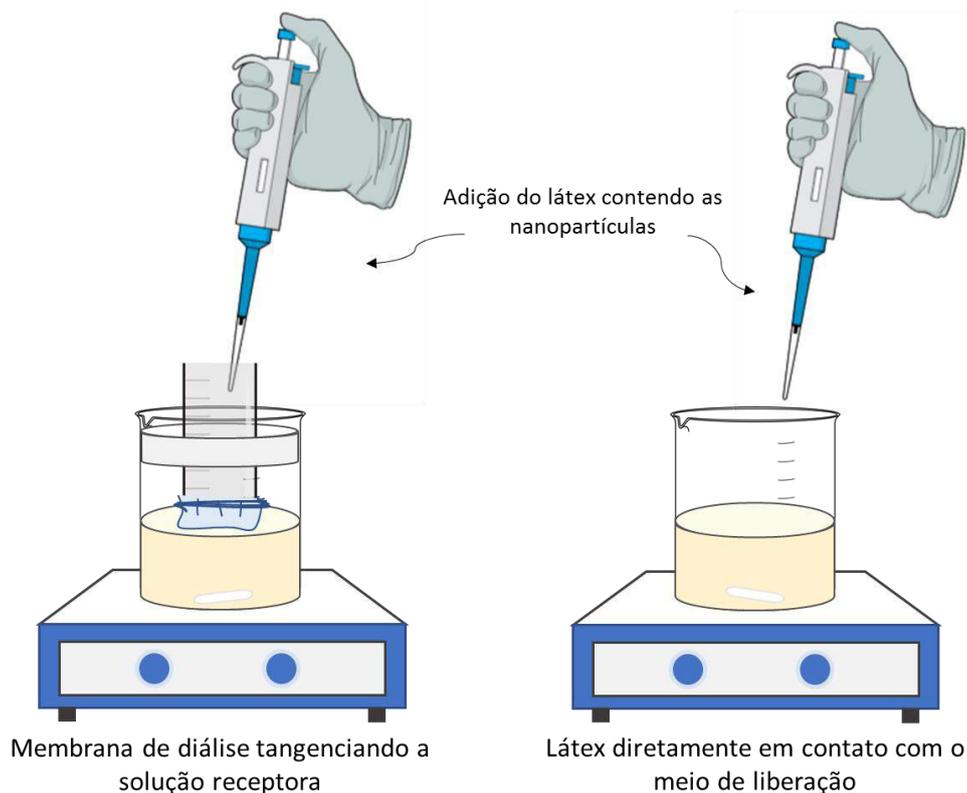


Figura 3.5: Montagens experimentais para testes de liberação.

A membrana de diálise foi presa com elástico em um tubo tipo *Falcon* com a base cortada e posicionada de modo a tangenciar a solução receptora. Para o caso do látex adicionado diretamente em contato com o meio de liberação, as amostras recolhidas foram filtradas em membrana de 100 kDa (AMICON Ultra-15 100 K, Millipore, Massachusetts, EUA) a 5000 rpm por 10 min para separação do material. A quantificação do fármaco liberado foi inicialmente realizada por medidas em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 256 nm. As análises das amostras do meio de liberação foram realizadas sem nenhum tipo de diluição.

Não foram obtidos resultados satisfatórios nos primeiros ensaios. A concentração de fármaco nos testes era muito baixa e não detectável pelo método de UV-VIS. Dessa forma, aparentemente, não era verificada liberação do cloiquinol nos ensaios. A metodologia de quantificação do fármaco não pareceu ser adequada, sendo necessário o uso de cromatografia líquida de alta eficiência, que apresenta uma maior sensibilidade.

Além disso, suspeitou-se ainda que o meio de liberação não garantia a liberação do fármaco, uma vez que o cloiquinol apresenta baixa afinidade pela água. BALAKRISHNAN *et al.* (2004) recomendaram a utilização de soluções tamponadas contendo agentes surfactantes como meio receptor em ensaios de liberação, quando o

fármaco estudado apresenta baixa hidrofiliabilidade. Segundo os autores, a dissolução do fármaco sem a presença do surfactante ocorre pela formação de uma solução saturada do fármaco livre na interface com o meio de liberação. Na presença de surfactante em altas concentrações, as micelas promovem a dissolução do fármaco, aumentando a solubilidade. Quando usado em baixas concentrações, o surfactante atua diminuindo a tensão interfacial, o que também facilita a dissolução do fármaco. Dessa forma, com o objetivo de definir a melhor condição para os ensaios de liberação, foram realizados testes de solubilidade do fármaco clioquinol em PBS, utilizado como meio de liberação, contendo diferentes concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS).

O ensaio de liberação foi realizado em recipiente de vidro, sendo o látex contendo as nanopartículas adicionado diretamente no meio (volume de látex igual a 1 mL), em condições que tentavam simular as condições *in vivo*. Foi utilizado tampão de fosfato salino (PBS) no pH de 7,4 e contendo SDS, na concentração definida pelo teste de solubilidade, como meio de dissolução (volume de meio de liberação igual a 29 mL) na temperatura de 37 °C e sob constante agitação magnética (400 rpm). Amostras da solução receptora (1 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e iguais volumes de meio foram repostos, garantindo a manutenção das condições *sink*. Após purificação da amostra recolhida por filtração em membrana de 100 kDa (AMICON Ultra-15 100 K, Millipore) a 6000 rpm por 10 min, a concentração do fármaco liberado na fase receptora foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cujo método de detecção foi desenvolvido e avaliado para a aplicação. Todas as amostras injetadas no cromatógrafo foram previamente filtradas em filtro de seringa de 22 µm para evitar entupimento nas linhas do equipamento.

Os resultados obtidos foram ajustados aos modelos matemáticos de liberação comumente utilizados, como modelo de ordem zero e primeira ordem, modelo de Higuchi e Peppas, a fim de avaliar a cinética de liberação.

3.6.1 Teste de solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado com o objetivo de determinar a concentração de surfactante que deveria ser adicionada ao meio de liberação para garantir adequada dissolução do clioquinol.

O fármaco clioquinol foi adicionado em tubos de ensaio contendo a solução tampão de PBS com diferentes concentrações de SDS. A concentração de clioquinol foi mantida em 10 mg/mL em cada tubo. Avaliou-se a adição de 1 a 5% (m/v) de SDS na

solução tampão. Os tubos foram mantidos sob agitação de 150 rpm em *shaker*, na temperatura de 37 °C, durante 24 horas. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e a concentração máxima de clioquinol no sobrenadante foi avaliada por espectrofotometria UV-VIS, mediante determinação de uma curva de calibração para cada condição.

3.6.2 Determinação e validação do método de quantificação do clioquinol por HPLC

O objetivo da técnica de cromatografia é separar individualmente os constituintes de uma mistura para sua identificação, quantificação ou obtenção da substância pura.

O desenvolvimento do método analítico para quantificação do clioquinol foi realizado por meio de adaptações de métodos já existentes na literatura (European Pharmacopoeia, 2005; CHHALOTIYA *et al.*, 2014) e a validação do método foi feita de acordo com a resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e com base no Guia de Esclarecimentos sobre a Aplicação da RE Nº 899/2003 (ANVISA, 2008).

Conforme mostrado na Tabela 3.2, a fase móvel utilizada era composta por acetonitrila e água, na proporção de 90/10 (v/v), respectivamente, em modo isocrático e sob vazão de 1 mL/min. O comprimento de onda de absorção máxima do clioquinol foi determinado em 254 nm, de acordo com CHHALOTIYA *et al.* (2014) e o tempo de cada corrida estabelecido em 10 min. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL e os ensaios realizados em temperatura ambiente.

Tabela 3.2: Condições usadas para o método cromatográfico utilizado para quantificação do clioquinol.

Parâmetro	Condição
Fase móvel	Acetonitrila / Água (90/10) (v/v)
Modo	Isocrático
Fluxo	1 mL/min
Comprimento de onda	254 nm
Injeção	20 µL
Tempo	10 min (retenção em 2,7 min)
Temperatura	ambiente

Segundo a ANVISA (2003), o objetivo de uma validação é mostrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, sendo que todo método desenvolvido e não descrito em farmacopeias ou formulários oficiais deve ser validado. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade verifica a capacidade de o método medir exatamente um composto na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e demais constituintes do sistema. A seletividade para o fármaco clioquinol foi avaliada pela análise cromatográfica dos componentes do sistema separadamente, sendo os cromatogramas obtidos posteriormente analisados em conjunto.

O estudo da linearidade permite demonstrar que as respostas obtidas são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico de avaliação. As soluções padrões obtidas para construção da curva analítica foram filtradas em membrana com tamanho de poro de 0,45 μm e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os respectivos valores das áreas. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste dos mínimos quadrados, a partir de regressão linear.

A curva analítica foi construída em sete níveis de concentração, no intervalo de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Para a montagem da curva, preparou-se uma solução estoque de clioquinol em ACN de 100 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução, foram realizadas diluições, obtendo-se as concentrações de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo avaliadas três curvas.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, tendo sido neste trabalho avaliada em dois níveis: precisão intra-corrída e inter-corrída. A primeira permite verificar a repetibilidade dos resultados dentro de um curto período de tempo e a segunda visa confirmar a concordância dos resultados em dias diferentes. Foram realizadas três determinações consecutivas de soluções do fármaco nas concentrações mínima, média e máxima da curva de linearidade, 1, 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No caso do teste de precisão inter-corrída, a análise foi realizada em dois dias. O desvio padrão relativo das medidas realizadas deve estar abaixo de 5%.

A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do fármaco quando presente em solução de todos os constituintes do sistema. A exatidão do método deve ser determinada em três níveis de concentração, sendo elas os pontos mínimo, médio e máximo da curva de calibração, com três réplicas cada. Assim, o resultado deve ser expresso como a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, devendo

estes estar entre 80 e 120%. Para o teste de exatidão, as amostras foram contaminadas com solução polimérica a 1% (m/m) em ACN, tendo sido sua concentração avaliada em 0,9, 18 e 45 µg/mL.

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob condições experimentais estabelecidas, constitui o limite de detecção (LD), expresso pela Equação 3.2.

$$LD = \frac{3 \cdot DP}{\beta} \quad (3.2)$$

em que DP o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas obtido a partir de no mínimo três curvas de calibração; e β é o coeficiente angular da curva de calibração.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas e pode ser expresso pela Equação 3.3.

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{\beta} \quad (3.3)$$

em que DP e β apresentam o mesmo significado que na Equação 3.2.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PERMEAÇÃO NA BHE *in vivo*

A capacidade de permeação das partículas na BHE foi realizada por meio de experimentos *in vivo*, em parceria com o Núcleo de Neurociências da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Todos os ensaios foram realizados de acordo com as normas para manuseio de animais.

Para os testes foram utilizados camundongos adultos fêmeas swiss e a preparação contendo as nanopartículas foi administrada pelas vias intraperitoneal (IP), endovenosa (EV) ou intracraniana (IC). A via intraperitoneal é normalmente a mais utilizada em experimentos com roedores, sendo a amostra injetada entre os órgãos abdominais (TABORDA *et al.*, 2004). A quantidade máxima de suspensão injetada foi de 10 µL/g do animal, sendo que no látex a concentração de partículas era igual a 100 mg/mL. Uma parte do produto administrado no peritônio pode ficar sujeita a atividade metabolizante do fígado, devido a possível absorção pela circulação portal (TABORDA *et al.*, 2004). A administração diretamente na corrente sanguínea é feita por via

endovenosa e possibilita uma rápida distribuição no organismo. O procedimento pode ser realizado pela veia caudal ou retro orbital do animal. Na via intracraniana tem-se a inserção da amostra é feita diretamente no cérebro (PAIVA *et al.*, 2005). Para a utilização das duas últimas vias de administração, os animais devem estar devidamente sedados durante o procedimento. A Figura 3.6 mostra um esquema ilustrativo das vias de administração descritas.

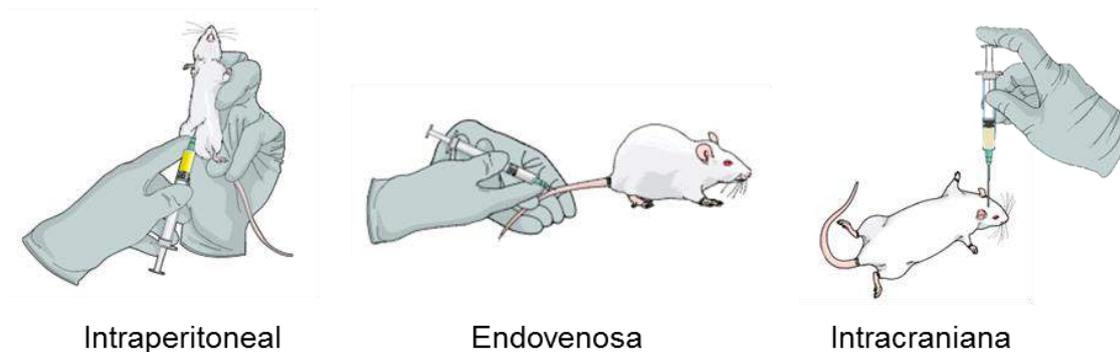


Figura 3.6: Vias de administração da preparação contendo as nanopartículas nos camundongos.

Após procedimento de administração das preparações e intervalo para circulação no organismo (iniciado em 2 horas e posteriormente definidos ao longo dos resultados obtidos), os animais foram eutanaziados e os cérebros e demais órgãos foram dissecados. Durante o intervalo de tempo para circulação das nanopartículas, os animais foram mantidos em ambiente de conforto térmico, com água e alimentação à vontade.

Foram realizadas análises em espectrofotômetro de fluorescência para verificação da passagem das partículas pela BHE, uma vez que as partículas apresentavam o marcador 2-Abz imobilizado pela rota de funcionalização com EDC.

Para as análises, os tecidos dissecados foram macerados e homogeneizados com 500 μ L de solução tampão de PBS (pH = 7,4) contendo 2% (m/v) de SDS. O surfactante foi utilizado para favorecer a ruptura das células. As amostras obtidas foram congeladas para posterior análise. A Figura 3.7 apresenta um esquema ilustrativo do procedimento descrito.

Um teste preliminar para avaliação da técnica pretendida e verificação de possíveis interferentes foi conduzido com a adição das nanopartículas diretamente ao macerado de cérebro de um animal não tratado.

A possibilidade de as nanopartículas ficarem concentradas em algum órgão nos animais e não conseguirem chegar ao cérebro foi também avaliada. Neste caso, a amostra foi administrada pelas vias periféricas IP ou EV, sendo os seguintes órgãos

dissecados: cérebro, fígado, coração, baço e rim. Os órgãos foram preparados seguindo o procedimento para análise por fluorescência esquematizado na Figura 3.7 e as amostras diluídas na razão de 1/200 em tampão de PBS.

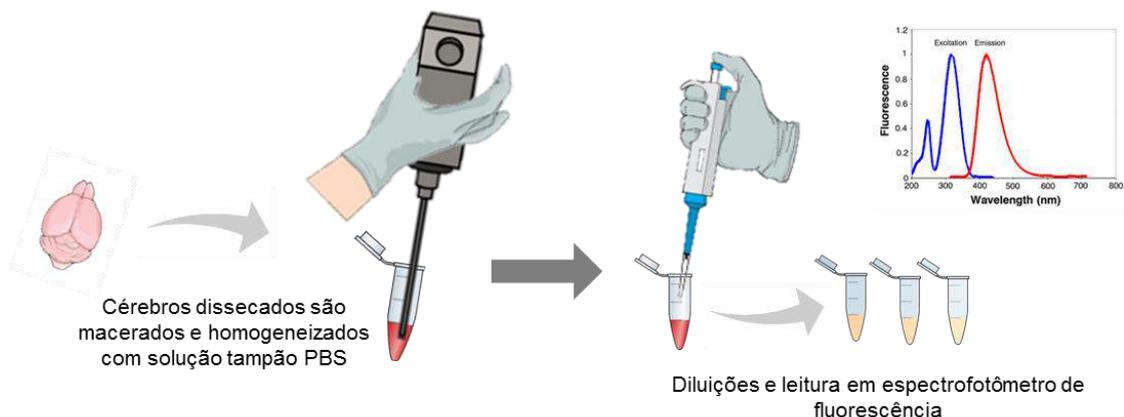


Figura 3.7: Procedimento para preparo das amostras para análise por fluorescência.

Foi também realizado um experimento para avaliação da dinâmica das partículas no sangue. As amostras foram injetadas via EV e alíquotas de sangue foram coletadas pela cauda do animal em intervalos de tempos determinados. O sangue coletado foi analisado por fluorescência após diluição na razão de 1/1250 em tampão de PBS, sem nenhum tipo de purificação prévia.

A técnica de microscopia foi também explorada para avaliação da permeação das partículas. Neste caso, após procedimento de administração das amostras, os animais foram perfundidos com paraformaldeído na concentração de 4% (m/v) em tampão PBS e os cérebros removidos e acondicionados na solução de paraformaldeído por 24 horas para fixação. Logo depois, o tecido foi preservado em solução de sacarose (30% m/v) e enviado para cortes histológicos em criostato e preparação das lâminas. Foram realizados três cortes longitudinais separados a 100 μ m em cada cérebro. O procedimento de preparo das lâminas foi realizado no setor de histologia do Hospital Universitário da UFRJ. As lâminas foram montadas em glicerina tamponada, pH = 8,6 (solução de glicerol (90% v/v) e PBS (10% v/v), para reduzir o efeito de autofluorescência. A Figura 3.8 apresenta um esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para esta técnica.

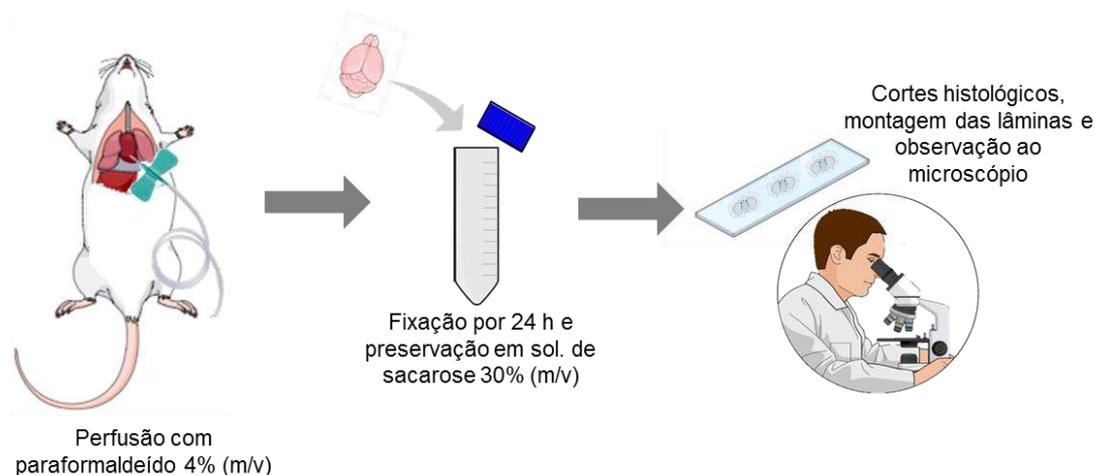


Figura 3.8: Procedimento usado para preparo das amostras para análise por microscopia.

3.8 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DIFUSÃO *in vitro*

Testes de citotoxicidade e difusão *in vitro* foram realizados em parceria com pesquisadores da Fiocruz-RJ. Inicialmente foram conduzidos ensaios para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações das amostras de nanopartículas na viabilidade e proliferação da linhagem de células do epitélio intestinal humano (Caco-2). As células Caco-2 são comumente utilizadas como modelo para transporte de fármacos através de barreiras. Esta linhagem celular pode ser utilizada como modelo da BHE porque apresenta características típicas das células da membrana encefálica, como a formação das “*Tight junctions*” e expressão de transportadores de glicoproteínas (ARTURSSON *et al.*, 2001; FAASSEN *et al.*, 2003).

Para o teste de citotoxicidade, a linhagem de células Caco-2, derivadas de um adenocarcinoma do cólon humano (ATCC HTB-37TM), foi cultivada em placa de 96 poços, contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 4,5 g/L de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo a placa mantida a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram cultivadas por 5 a 7 dias, garantindo a formação de uma monocamada íntegra.

Após preparação das células, as amostras de látex de nanopartículas foram inoculadas. Partindo-se de uma concentração de 8000 µg/mL de nanopartículas, os poços contendo as células foram preenchidos por sucessivas diluições na razão de 1/3. Dessa forma, a faixa de concentração de nanopartículas avaliadas foi de 4 – 8000 µg/mL. A cultura de células foi em seguida incubada por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada por ensaios de bioluminescência, baseados na reação luciferin-luciferase

(SMALÉ, 2010), sendo calculada a CC50, que representa a concentração de nanopartículas que induz 50% de lise ou morte celular.

Com a determinação da faixa de concentração de nanopartículas sem efeitos citotóxicos, iniciaram-se os testes para avaliação da permeabilidade celular. Foram utilizadas câmaras de cultivo *transwell* para avaliar os níveis de nanopartículas (preparações com e sem o peptídeo TAT) difundidas através da monocamada de células Caco-2, conforme o esquema mostrado na Figura 3.9.

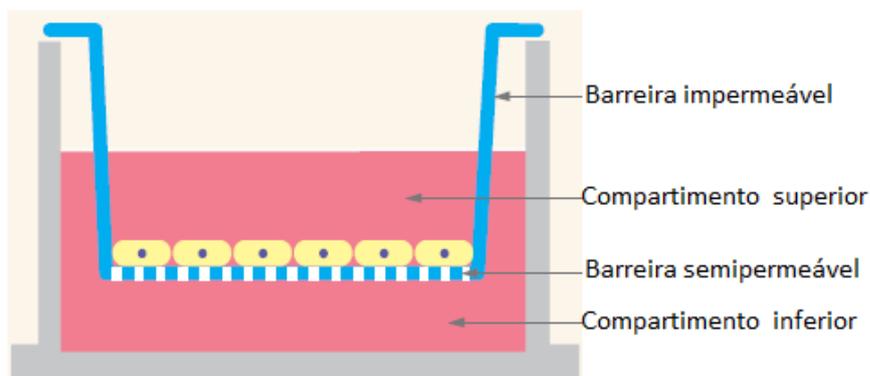


Figura 3.9: Sistema de cultivo *transwell*, modelo de cultivo simples para avaliação de passagem de fármacos por barreira celular.

Adaptada de RAGNAILL *et al.* (2011).

As células foram cultivadas de modo semelhante ao do ensaio de citotoxicidade, com densidade celular de 2×10^5 células em cada câmara *transwell*. As amostras de nanopartículas, marcadas com o fluoróforo 2-Abz, foram adicionadas no compartimento superior da câmara e o sistema foi incubado por 4 horas, de acordo com procedimento descrito por RAGNAILL *et al.* (2011). As concentrações das nanopartículas obtidas no compartimento inferior e superior foram determinadas por meio de técnicas de fluorescência.

Como controles positivos deste teste, foram utilizadas uma câmara *transwell* sem a camada de células, para avaliar se a estrutura e composição da membrana poderia influenciar a passagem das partículas, e células tratadas com solução de EDTA a 2 mM, em temperatura de 37 °C por 3 horas, para promover a abertura das junções celulares.

A determinação da possível penetração no cérebro e toxicidade é importante para a avaliação de novos fármacos destinados ao tratamento de doenças que afetam o SNC e também para verificar a incidência de efeitos colaterais.

3.9 COMENTÁRIOS FINAIS

Foram apresentadas e descritas neste capítulo as metodologias experimentais adotadas para produção e caracterização dos sistemas poliméricos inerentes ao desenvolvimento da pesquisa. A rota dos ensaios experimentais foi planejada de modo a cobrir todos os objetivos delineados neste trabalho, que correspondiam o preparo das nanopartículas poliméricas contendo um fármaco encapsulado, a funcionalização da superfície pela conjugação de biomoléculas e a avaliação da capacidade do sistema desenvolvido para transposição à BHE. Sendo assim, algumas etapas foram conduzidas nos laboratórios de Engenharia de Polímeros (ENGEPOL) e Fenômenos Interfaciais (GRIFT), como a produção das nanopartículas, a avaliação do encapsulamento do fármaco, a funcionalização e os testes de liberação do fármaco. Os ensaios para avaliação da capacidade das nanopartículas em atravessar a BHE foram realizados em parceria com laboratórios da Faculdade de Farmácia da UFRJ e da Fiocruz/RJ. O sucesso dessa pesquisa poderá contribuir para o desenvolvimento de um novo produto, cuja demanda é crescente, e poderá servir de plataforma para geração de outros produtos com finalidades semelhantes, para o tratamento de outras doenças. Além disso, o estudo pode ajudar a elucidar os fenômenos envolvidos na atuação do complexo fármaco/nanopartícula no organismo.

Capítulo IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

4.1 AVALIAÇÃO DO SURFACTANTE NAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

Inicialmente foi conduzido um planejamento experimental 2^3 , com triplicata nos pontos centrais, para avaliação da influência do surfactante na produção das nanopartículas. A concentração e tipo de surfactante empregado podem influenciar a estabilidade da emulsão produzida e, conseqüentemente, o tamanho final das partículas. Além disso, estas variáveis podem interferir na carga elétrica líquida das partículas, devido à tendência natural de adsorção na interface.

O plano fatorial foi formulado de modo a cobrir todas as possíveis combinações de condições geradas no intervalo de investigação. A utilização deste tipo de procedimento permite discriminar as variáveis que afetam o sistema de forma significativa, além de permitir a distinção do grau de relevância de cada uma delas.

Utilizando o sonicador como meio de dispersão, observou-se que as pré-emulsões tipicamente obtidas apresentavam intensa coloração branca, como mostrado na Figura 4.1.

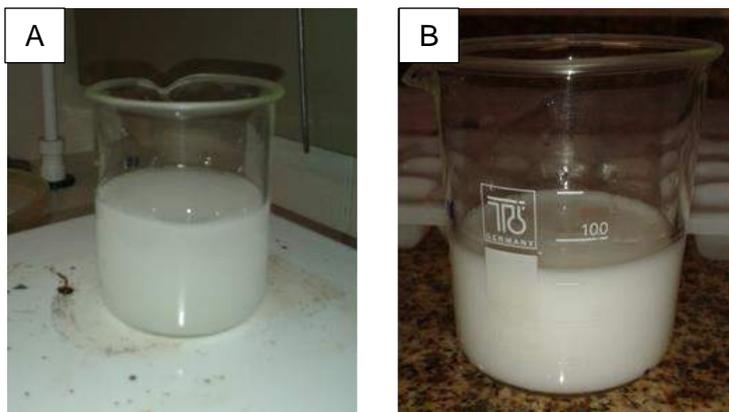


Figura 4.1: Comparação visual do aspecto da emulsão, após agitação magnética (A) e após dispersão em ultrassom (B).

Apresentam-se na Tabela 4.1 os resultados obtidos para as medidas de tamanho e potencial zeta das amostras após a reação de polimerização. Note que a faixa de concentração das variáveis de entrada encontra-se na Tabela 3.2.

Tabela 4.1: Resultados do planejamento experimental após a polimerização.

Teste	Agente	Concentração	O/A	Diâmetro médio (nm)	*PDI	Potencial Zeta (mV)
1	-1	-1	-1	157	0,013	-43,3
2	-1	-1	1	149	0,023	-49,6
3	-1	1	-1	55	0,064	-52,8
4	-1	1	1	64	0,068	-43,7
5	1	-1	-1	Não medido	-	-
6	1	-1	1	Não medido	-	-
7	1	1	-1	72	0,019	+42,5
8	1	1	1	75	0,012	+34,6
9	-1	0	0	72	0,011	-49,6
10	-1	0	0	71	0,033	-54,2
11	-1	0	0	76	0,019	-56,9
12	1	0	0	109	0,195	+44,1
13	1	0	0	105	0,008	+41,7
14	1	0	0	111	0,152	+40,1

*PDI = índice de polidispersão.

As condições experimentais dos testes 5 e 6 levaram a aglomeração descontrolada das partículas.

Como anteriormente apresentado, foram avaliados os agentes surfactantes SDS e CTAB, em concentrações na faixa de 1 a 5% e razão O/A de 15 a 25%.

De acordo com os resultados da Tabela 4.1, foram obtidas partículas de tamanho nanométrico, exceto nas condições dos testes 5 e 6, em que a miniemulsão foi desestabilizada, levando à aglomeração descontrolada do sistema. Nos dois testes em questão, foi utilizado como surfactante o CTAB, na concentração de 1%. Provavelmente esta concentração não foi suficiente para estabilização das gotas de monômero. É importante ressaltar que o CTAB é mais hidrofóbico, ou seja, neste sistema apresenta menor tendência de permanecer na interface, o que causa um efeito indutivo, não sendo totalmente eficiente na estabilização das gotas

*PDI: Medida da amplitude da distribuição de tamanhos (variância relativa), calculada a partir da curva de análise cumulativa dos dados, de acordo com a ISO 13321:1996; $PDI = \sigma^2/\bar{x}^2$ (σ é o desvio padrão e \bar{x} é o tamanho médio), Valores menores que 0,04 são considerados monodispersos (NIST, 2015).

A Figura 4.2 apresenta o aspecto das amostras obtidas nestes testes. Os testes indicaram variações pronunciadas das propriedades finais como função das condições de operação empregadas. Observa-se em particular a excelente reprodutibilidade dos testes conduzidos. As distribuições de tamanhos de partícula encontram-se no APÊNDICE C.



Figura 4.2: Amostras obtidas nos testes 5 e 6, respectivamente.

Em relação ao índice de polidispersão (PDI), que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foram obtidos valores baixos ($< 0,2$), indicando a formação de distribuições de tamanhos estreitas e monodispersas.

A respeito dos potenciais zeta, foram obtidos valores negativos para as amostras preparadas com SDS, e positivo para as amostras preparadas com CTAB, como era esperado, dadas as naturezas de cada um dos surfactantes. Os valores se apresentaram altos, maiores que 30 mV em módulo em todas as condições experimentais, sugerindo que a estabilidade das dispersões está fortemente relacionada com a repulsão eletrostática. Não foram realizadas medidas para as amostras dos testes 5 e 6.

Utilizou-se o programa STATISTICA 10 para ajustar os dados experimentais a um modelo empírico, com o objetivo de avaliar a influência das variáveis estudadas no tamanho de partícula e potencial zeta. Os modelos obtidos foram verificados pelos testes Chi-quadrado e F, sendo a equação aceita somente quando as condições dos testes foram satisfeitas (SCHWAAB e PINTO, 2007).

O modelo obtido para o tamanho das partículas (dp) é apresentado na Equação 4.1.

$$dp = (91 \pm 2) + (18 \pm 2) \cdot x_1 - (57 \pm 4) \cdot x_2 - (11 \pm 4) \cdot x_1 \cdot x_2 + (4 \pm 2) \cdot x_2 \cdot x_3 + (33 \pm 4) \cdot x_2^2 \quad (4.1)$$

Nesta equação, x_1 representa o tipo de surfactante, x_2 é a concentração de surfactante e x_3 é a razão O/A. Os parâmetros são reportados como os valores obtidos e os respectivos intervalos de confiança, calculados com a distribuição t-Student com 95% de confiança (SCHWAAB e PINTO, 2007) Todos os parâmetros do modelo são significativos. O coeficiente de correlação entre os valores experimentais e o modelo foi de 0,998.

Na Equação 4.1 foi incluído um termo quadrático, contudo o plano fatorial desenvolvido não permite a distinção de efeitos desta natureza. Os efeitos quadráticos são confundidos entre as variáveis, não sendo possível determinar a qual variável o efeito pertence (SCHWAAB e PINTO, 2007). Com a ausência de resposta para os testes 5 e 6 do planejamento proposto verificaram-se algumas correlações entre os parâmetros estimados, de modo que a inferência a respeito de cada uma das variáveis ficou um pouco prejudicada. Os resultados do procedimento de estimação de parâmetros são mostrados em detalhes no APÊNDICE D.

De acordo com os valores obtidos, a concentração de surfactante exerce maior influência sobre o tamanho das partículas. Como o parâmetro estimado é negativo, uma maior concentração de surfactante leva a menores tamanhos de partícula, como esperado. A maior concentração de surfactante na região superficial das partículas diminui a possibilidade destas se agregarem, pela diminuição da energia de superfície e pela barreira eletrostática imposta, garantindo tamanhos menores. A utilização do surfactante CTAB leva a formação de partículas de maiores diâmetros, possivelmente devido à maior cadeia de carbonos (CTAB - $C_{19}H_{42}NBr$ e SDS - $C_{12}H_{25}NaO_4S$). Efeitos de interação entre as variáveis podem ser também observados, porém menos pronunciáveis.

No caso do potencial zeta, o modelo obtido é apresentado na Equação 4.2.

$$zeta = -(5 \pm 2) + (45 \pm 2) \cdot x_1 - (4 \pm 4) \cdot x_1 \cdot (x_2^2 - \frac{8}{14}) \quad (4.2)$$

De acordo com o modelo, o último parâmetro estimado foi não significativo, porém este foi mantido na análise por proporcionar uma melhor relação com os dados experimentais. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,997. Para o potencial zeta, o tipo de surfactante é o que mais influencia a carga superficial da partícula obtida, como esperado. As moléculas do surfactante encontram-se na superfície das partículas e definem a carga observada. Como esperado, as partículas com SDS apresentaram-se negativas, uma vez que se trata de um surfactante aniônico, enquanto que as partículas

preparadas com CTAB apresentaram potencial zeta positivo, sendo a molécula catiônica.

Com base nos resultados obtidos pelo planejamento experimental, foram escolhidas as condições experimentais dos testes 2 (-1; -1; 1) e 4 (-1; 1; 1) para seguir as reações de produção das nanopartículas do copolímero de MMA e AA e também para avaliação do encapsulamento do fármaco, uma vez que estas condições forneciam partículas com propriedades de tamanho e carga superficial adequadas às aplicações pretendidas. As duas condições experimentais selecionadas utilizam SDS como surfactante que fornece partículas com carga negativa. Os tamanhos de partículas obtidos nestas condições estão em torno de 60 a 150 nm. A utilização de uma menor concentração de surfactante (condição do teste 2) é, em primeiro momento, mais interessante.

É importante ponderar que nestes testes não foi avaliada a utilização de um surfactante não iônico, como por exemplo polisorbatos. A utilização de outros surfactantes pode também ser explorada para garantir maior entendimento da atuação destes compostos no processo de polimerização em miniemulsão. Além disso, para as aplicações biomédicas pretendidas, é de extrema importância estudar os efeitos dos surfactantes em relação à toxicidade e interação com fluidos biológicos. As agências de saúde têm comentado a respeito da utilização de tensoativos naturais, sendo estes mais adequados para o objetivo final de aplicação no organismo. Dessa forma, torna-se interessante o estudo de outros agentes surfactantes, como a lecitina.

4.2 REAÇÕES DE COPOLIMERIZAÇÃO

4.2.1 Avaliação do tamanho de partícula e potencial zeta

As reações de copolimerização do MMA com AA ou MAA foram realizadas com o intuito de inserir grupos ácidos à cadeia do polímero. Na Figura 4.3 apresentam-se a emulsão inicial obtida e a interface O/A formada. Inicialmente, optou-se por selecionar a condição experimental do teste 2 do planejamento, sendo utilizado o SDS como surfactante na concentração de 1% em relação ao monômero e a razão O/A mantida em 25%. Nestas reações procurou-se avaliar o tipo de iniciador, KPS ou PBO, e a concentração de AA, 7% e 15%.

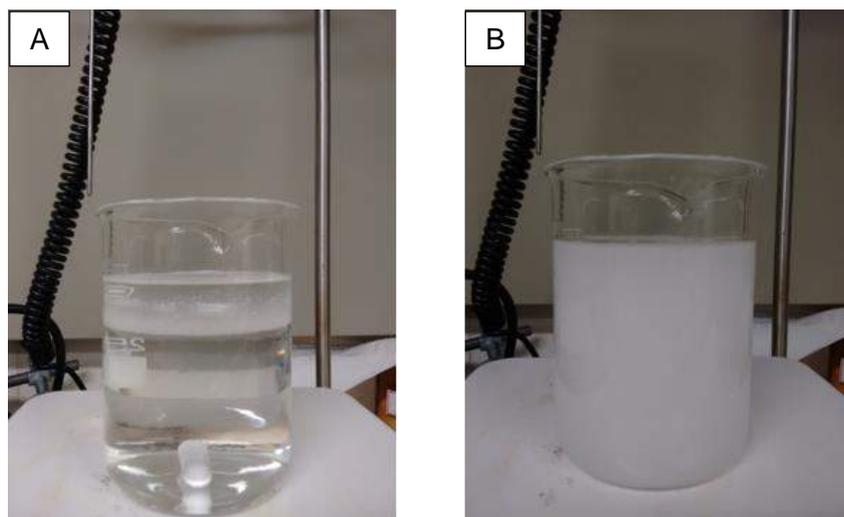


Figura 4.3: Fotografia da (A) Interface O/A formada e (B) emulsão inicial.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de tamanho volumétrico médio, índice de polidispersão dos tamanhos (PDI) e potencial zeta das amostras produzidas.

De acordo com a Tabela 4.2, foram obtidas partículas nanométricas, como esperado, com a metodologia proposta. O PDI apresentou valores muito baixos ($< 0,1$), indicando a formação de distribuições de tamanho estreitas e monodispersas. O potencial zeta das partículas apresentou-se negativo, devido ao surfactante aniônico utilizado. Observa-se ainda que as partículas produzidas com PBO apresentaram valores de potenciais zeta mais negativos. As distribuições de tamanho de partícula são mostradas no APÊNDICE C.

Tabela 4.2: Resultados de tamanho médio, PDI e potencial zeta para as nanopartículas produzidas com 1% de SDS.

Amostra	Reação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
PMMA	R01	129,9	0,02	-46,4
PMMA*PBO	R02	107,2	0,05	-60,7
P(MMA-co-AA) 7%	R03	125,3	0,02	-38,3
P(MMA-co-AA) 15%	R04	109,8	0,05	-47,6
P(MMA-co-AA) 15%*PBO	R05	142,6	0,08	-59,4

*PBO Amostras produzidas com iniciador PBO. Nos demais casos utilizou-se iniciador KPS. A concentração de surfactante SDS utilizada foi igual a 1% em relação ao monômero. Os índices 7% e 15% referem-se à porcentagem de AA na fase orgânica.

PEIXOTO *et al* (2016) observaram que o tipo de iniciador usado na reação de polimerização do MMA altera a dinâmica da reação e as propriedades do polímero final. As amostras produzidas com iniciador PBO apresentaram distribuições de tamanhos bimodal, prevalecendo o mecanismo de nucleação homogênea. Já as amostras produzidas com KPS apresentaram distribuições de tamanhos mais uniformes, com formação de partículas pequenas desde o início da reação, por conta da formação de radicais na fase aquosa diretamente. Em relação à copolimerização, a presença de AA provocou uma desaceleração da reação, para ambos os iniciadores; porém quando o iniciador KPS foi utilizado, o copolímero final apresentou diâmetro médio de partículas muito semelhantes àqueles do PMMA.

Depois de certo tempo (cerca de 6 meses) de estocagem, os látex produzidos sob estas condições apresentaram endurecimento, de forma que o produto não se mostrou muito estável. Atribuiu-se esta perda de estabilidade à concentração de surfactante utilizada na reação. Desse modo, foram realizados novos experimentos, conforme a condição estabelecida pelo teste 4 do planejamento, sendo utilizado o SDS como surfactante na concentração de 5% em relação ao monômero. Os valores de tamanho médio e potencial zeta obtidos neste conjunto de reações são apresentados na Tabela 4.3. Estes produtos não apresentaram perda de estabilidade após estocagem.

Conforme apresentado na Tabela 4.3, a utilização de uma maior concentração de surfactante permitiu a formação de partículas de menor tamanho, como já preconizado pelo modelo obtido no planejamento de experimentos anterior. Observa-se ainda que as partículas de PMMA apresentaram tamanhos menores que as partículas do copolímero. Como já esperado, o potencial zeta das amostras manteve-se negativo e semelhante em todos os casos, sugerindo que a concentração superficial do surfactante é a principal origem da carga das partículas. Provavelmente o número de grupos superficiais de ácido acrílico é reduzido e sua dissociação não interfere significativamente na carga líquida das partículas.

Em relação à distribuição de tamanhos, as réplicas dos copolímeros produzidos apresentaram boa reprodutibilidade, com curvas de distribuições de tamanhos mais largas, como mostrado na Figura 4.4. Devido as diferentes solubilidades em água e taxas de reatividade dos comonômeros utilizados (AA e MAA), a copolimerização modifica a natureza iônica da superfície das nanopartículas, podendo exercer um efeito significativo nas distribuições de tamanho de partícula em polimerizações por miniemulsão (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Tabela 4.3: Resultados de tamanho, PDI e potencial zeta para as nanopartículas.

Amostra	Reação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
PMMA	R06	57	0,07	-54
	R07			
P(MMA-co-AA)	R08	99 ± 11	0,13 ± 0,02	-53 ± 4
	R09			
	R13			
P(MMA-co-MAA)	R14	80 ± 3	0,247 ± 0,005	-60 ± 7
	R15			

Todas as amostras foram produzidas utilizando KPS como iniciador. Os valores indicados para o copolímero são referentes a três reações, sendo reportados como média ± desvio padrão.

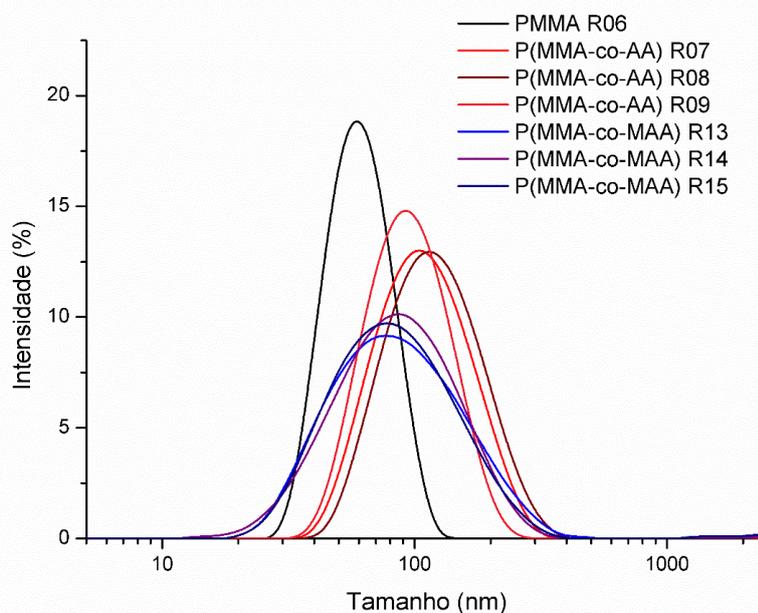


Figura 4.4: Distribuição de tamanho de partícula para as amostras finais de copolímero e de PMMA, conforme reações descritas na Tabela 4.3.

4.2.2 Conversão e massa molar

A evolução das reações de polimerização foi avaliada a partir do acompanhamento da conversão e da massa molar dos polímeros obtidos. A conversão foi calculada como uma relação entre a massa de polímero formada e a massa de fase orgânica inicial para intervalos de tempos definidos. Já a massa molar foi reportada como uma distribuição de massas molares em cada tempo de reação. Apresentam-se

na Figura 4.5 as curvas de conversão obtidas para a reação de polimerização do MMA e para as amostras do copolímero produzidas.

As reações de polimerização alcançaram conversão máxima logo nos primeiros minutos de acompanhamento. Na produção do copolímero observa-se um pequeno atraso na reação, sendo a conversão final alcançada alguns minutos depois. Esta pequena alteração da dinâmica da reação com a adição do AA ou do MAA foi também reportada por PEIXOTO *et al.* (2016), sendo observada uma desaceleração da reação, atribuída à formação de polímero na fase aquosa, já que esses monômeros formam polímeros muito solúveis em água.

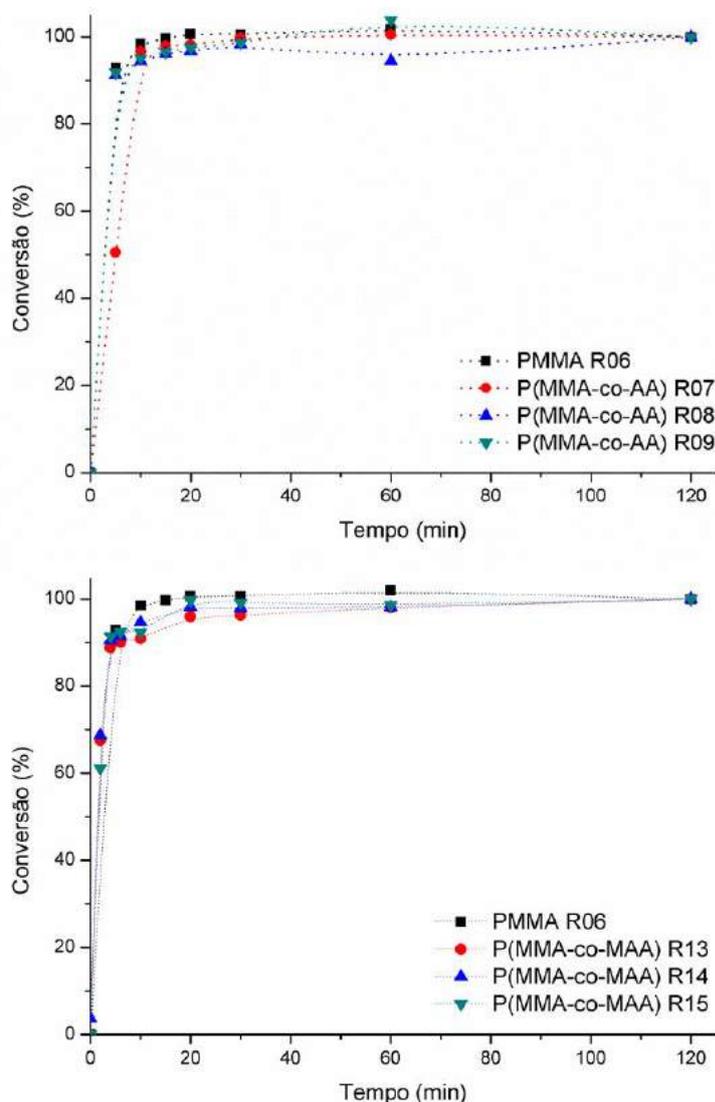


Figura 4.5: Curvas de conversão das reações descritas na Tabela 4.3.

As curvas obtidas para o acompanhamento das massas molares durante as reações complementam os resultados de conversão observados e anteriormente

descritos. A massa molar do polímero formado não se altera desde os 5 min de reação, uma vez que neste tempo já é verificada conversão máxima, como mostrado na Figura 4.6. As curvas obtidas para as demais reações são apresentadas no APÊNDICE E.

Pode-se notar ainda que as distribuições de massas molares para o PMMA e para os copolímeros são semelhantes. De acordo com os resultados obtidos, a inserção do AA ou do MAA, nas condições de polimerização, na reação não afeta significativamente o comportamento cinético, causando apenas um pequeno atraso na dinâmica da reação, como mostrado pela conversão.

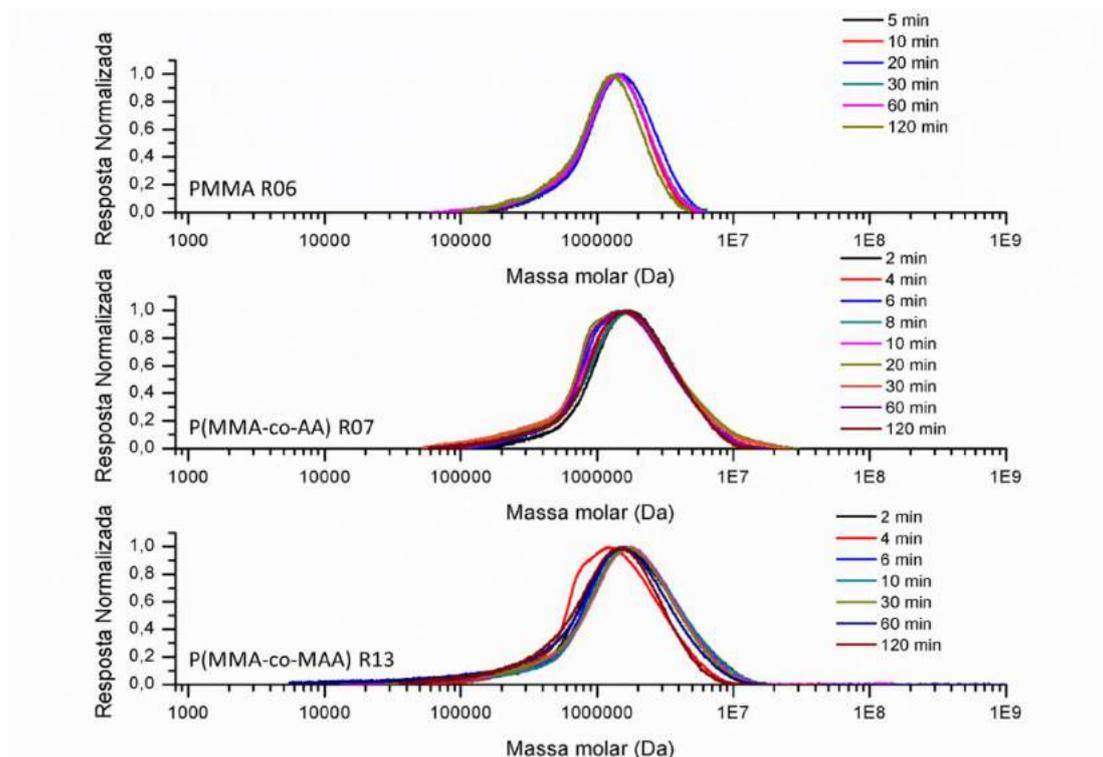


Figura 4.6: Distribuição de massas molares para PMMA R06, copolímero R07 e R13.

Na Tabela 4.4 podem ser visualizadas as a massas molares finais e o índice de polidispersão obtidos para os polímeros produzidos. A massa molar final do copolímero apresentou-se um pouco mais elevada que a do PMMA, em função da presença de ácido acrílico, que tipicamente produz polímero de massas molares mais elevadas (MEHRAVAR *et al.*, 2016).

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2013), as reações de polimerização via radicais livres costumam ser extremamente rápidas, levando à formação de cadeias “mortas” e longas rapidamente. Durante todo o tempo de reação, cadeias poliméricas são iniciadas, propagam e terminam de forma continuada até o completo esgotamento de monômero no meio reacional. Este fenômeno contínuo de geração e crescimento contribui para a formação de cadeias poliméricas de tamanhos heterogêneos, ocasionando altos índices

de polidispersão ($IP > 3,0$). Os índices de polidispersão obtidos para a amostra de PMMA e do copolímero com AA foram pequenos e resultantes de distribuições de massas molares estreitas. O comportamento deve-se à alta velocidade da reação e relativa uniformidade das condições de reação nas diferentes partículas. Para as amostras com MAA o índice de polidispersão apresentou um valor um pouco maior, típico de uma reação radicalar e provavelmente reflete a mudança das condições de reação ao longo da batelada, dado que o MAA não se dissolve preferencialmente na água e reage em taxas mais elevadas que o MMA.

Tabela 4.4: Massas molares médias (M_w) e índice de polidispersão (IP) de amostras obtidas ao final da reação.

Amostra	Reação	M_w Final (kDa)	IP
PMMA	R06	1205	1,7
P(MMA-co-AA)	R07		
	R08	1800 ± 500	$1,9 \pm 0,7$
	R09		
P(MMA-co-MAA)	R13		
	R14	1600 ± 200	$3,1 \pm 0,8$
	R15		

Todas as amostras foram produzidas utilizando KPS como iniciador. Os valores indicados para o copolímero são referentes a três reações, sendo reportados como média \pm desvio padrão.

É importante destacar também os altos valores de massa molar obtidos em todos os casos. As polimerizações em emulsão e miniemulsão, de um modo geral, produzem polímeros de alta massa molar, visto que as taxas de propagação são altas e as taxas de terminação são reduzidas (MEHRAVAR *et al.*, 2016). A taxa de terminação é baixa devido à pequena probabilidade de existência de dois radicais em uma mesma gota. Quando dois radicais se encontram em uma partícula a terminação é praticamente instantânea. Assim, a maior probabilidade é que em uma gota do sistema de polimerização exista um ou nenhum radical em propagação, o que causa o aumento da massa molar, uma vez que a propagação continua até que um segundo radical penetre na partícula. No caso específico ainda deste procedimento experimental, os altos valores de massas molares podem ser atribuídos a existência de um número de gotículas extremamente elevado.

4.2.3 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura

As nanopartículas de copolímero produzidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização morfológica e avaliação dos tamanhos de partícula. As imagens obtidas para a técnica de MEV, apresentadas na Figura 4.7, confirmam a presença de partículas esféricas e com distribuição de tamanhos praticamente homogênea. Os tamanhos de partículas visualizados nas imagens confirmam o tamanho obtido pela técnica de espalhamento de luz, anteriormente descrita. A aglomeração das partículas durante a secagem forma filmes pouco flexíveis, vistos como placas compactas em baixa magnitude.

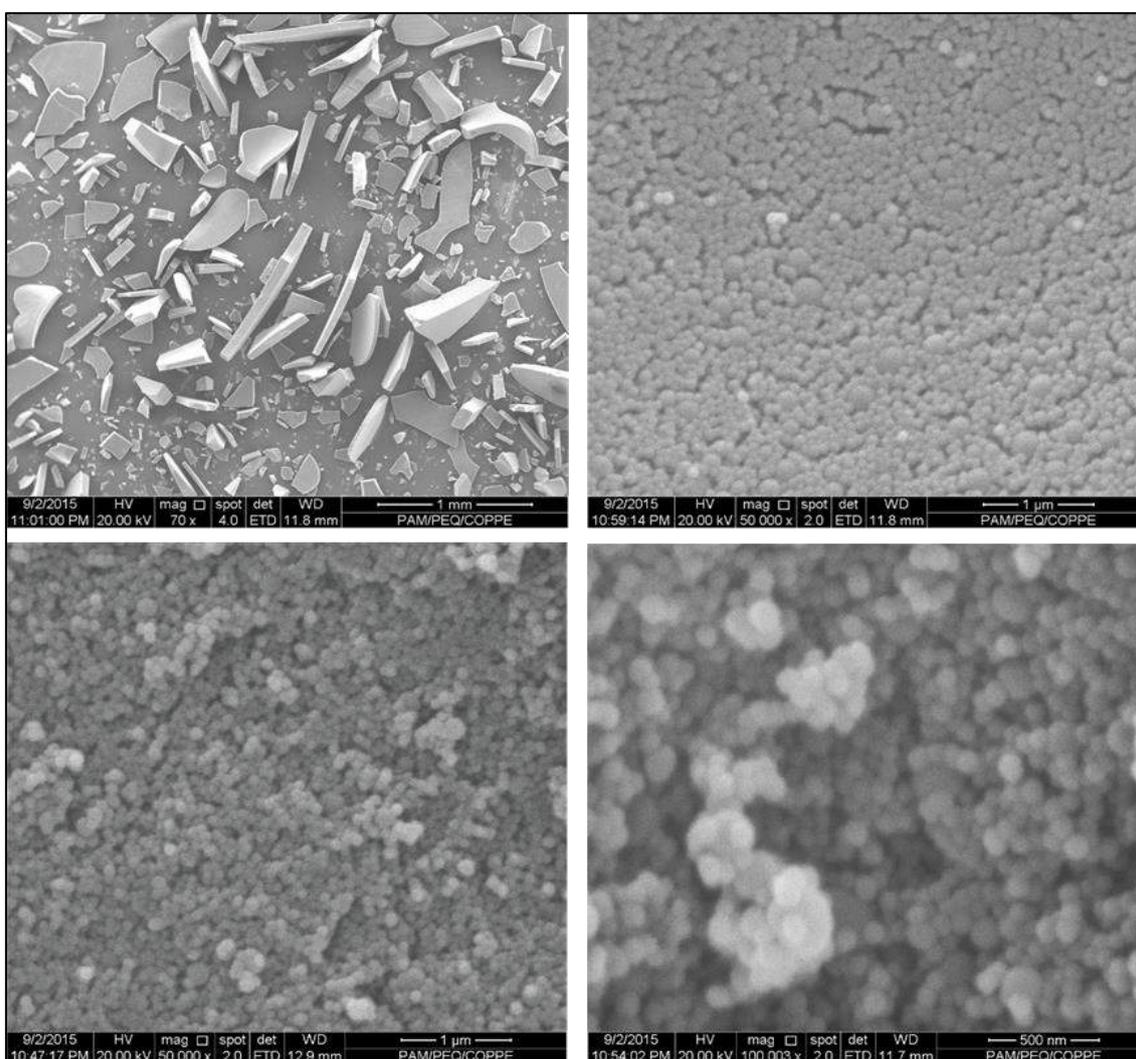


Figura 4.7: Imagens de MEV das nanopartículas de P(MMA-co-AA) produzidas com iniciador KPS (R07) em diferentes magnitudes.

4.2.4 Ensaio para avaliação da copolimerização

A avaliação da ocorrência de copolimerização foi feita com o auxílio de análises térmicas de DSC e TGA, da hidrofiliabilidade e por ensaios por RMN. Os resultados destas análises permitiram inferir a respeito do sucesso da copolimerização do MMA com AA ou MAA nas reações conduzidas.

As análises de DSC foram realizadas com o objetivo de determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos copolímeros, sendo as curvas de DSC obtidas apresentadas no APÊNDICE F.

Para o PMMA produzido verificou-se uma T_g de 123 °C, como mostrado na Figura 4.8, que é compatível com outros estudos da literatura (RODRIGUEZ *et al.*, 2003; PEIXOTO *et al.*, 2016). A T_g do PAA encontra-se na faixa de 75-106 °C (RODRIGUEZ *et al.*, 2003); por isso, com a copolimerização esperava-se que a T_g do material fosse deslocada para valores um pouco mais baixos. De acordo com os ensaios realizados, o P(MMA-co-AA) (R04) apresentou T_g de 106 °C, mostrado na Figura 4.8, e P(MMA-co-AA) (R05) apresentou T_g de 111 °C (conforme APÊNDICE F), o que constitui um indício do sucesso da copolimerização. A amostra de P(MMA-co-MAA) apresentou T_g de 137 °C (conforme APÊNDICE F). Este resultado também está de acordo com o esperado, uma vez que a T_g do homopolímero PMAA é igual a 228 °C (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Dessa forma, o copolímero produzido deveria apresentar uma T_g mais elevada que a do PMMA precursor. A existência de uma única transição térmica para o material produzido sugere a ocorrência da copolimerização, e não somente a mistura dos homopolímeros (RODRIGUEZ *et al.*, 2003).

A partir dos ensaios de TGA para as amostras produzidas, foi possível verificar o aumento da temperatura de degradação para o copolímero em relação ao PMMA, como era esperado, visto o resultado obtido para o PAA comercial. Isso constitui outro indício da ocorrência da copolimerização. A temperatura de máxima degradação das partículas de PMMA encontra-se em torno de 300 °C, enquanto para os copolímeros a temperatura de máxima degradação pode ser verificada em 350 - 380 °C. Além disso, o perfil de decaimento da curva se altera, como apresentado na Figura 4.9. Ressalta-se que o início da perda de massa observada nos termogramas é devido à perda de água do material. Esta perda de água inicial, não é, contudo, observada como um evento térmico no DSC.

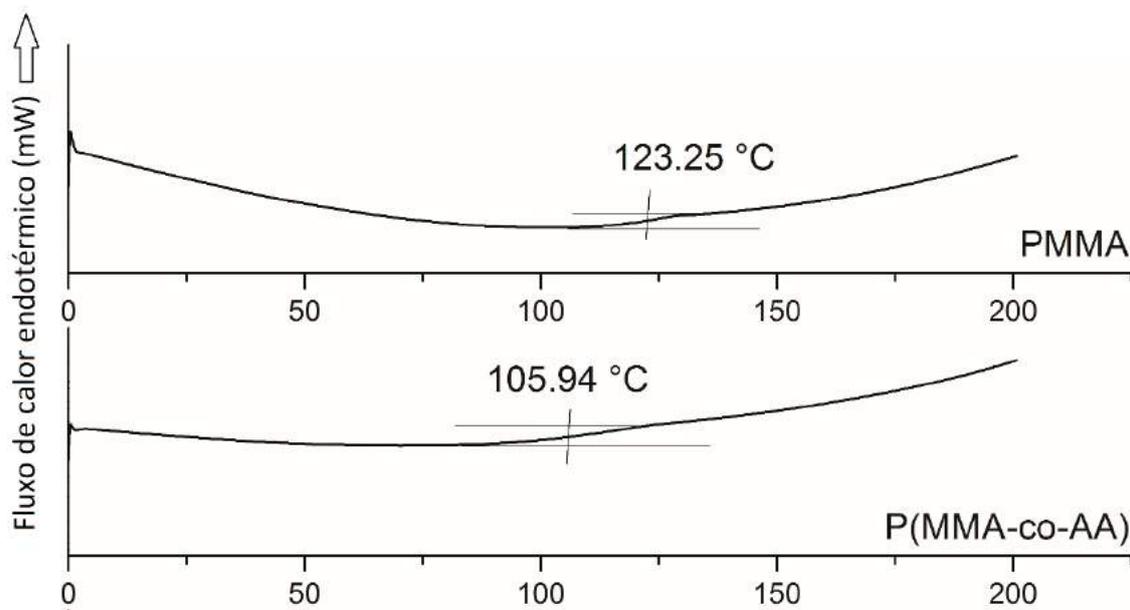


Figura 4.8: Termograma de DSC para amostra de PMMA (R01) e P(MMA-co-AA) R(04).

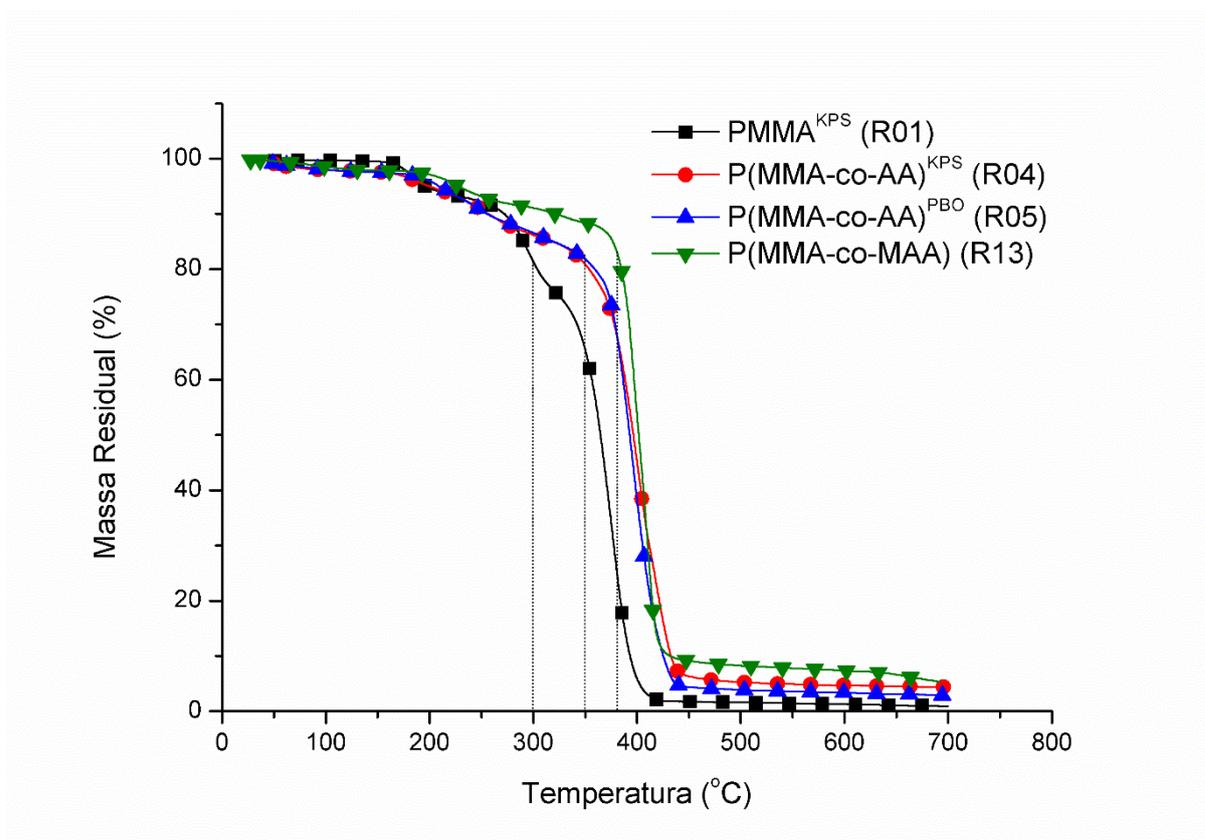


Figura 4.9: Termogramas de TGA obtidos para algumas amostras produzidas.

Realizaram-se também medidas de ângulo de contato da água para o PMMA e para os copolímeros, com o intuito de inferir a respeito da hidrofiliicidade dos materiais. Os copolímeros produzidos apresentam grupos funcionais ácidos, tornando-os mais hidrofílicos. Este fato pode ser observado pelo menor ângulo de contato obtido para os copolímeros, cerca de 35 - 37°, em relação ao homopolímero, aproximadamente 57°, conforme mostrado na Figura 4.10.

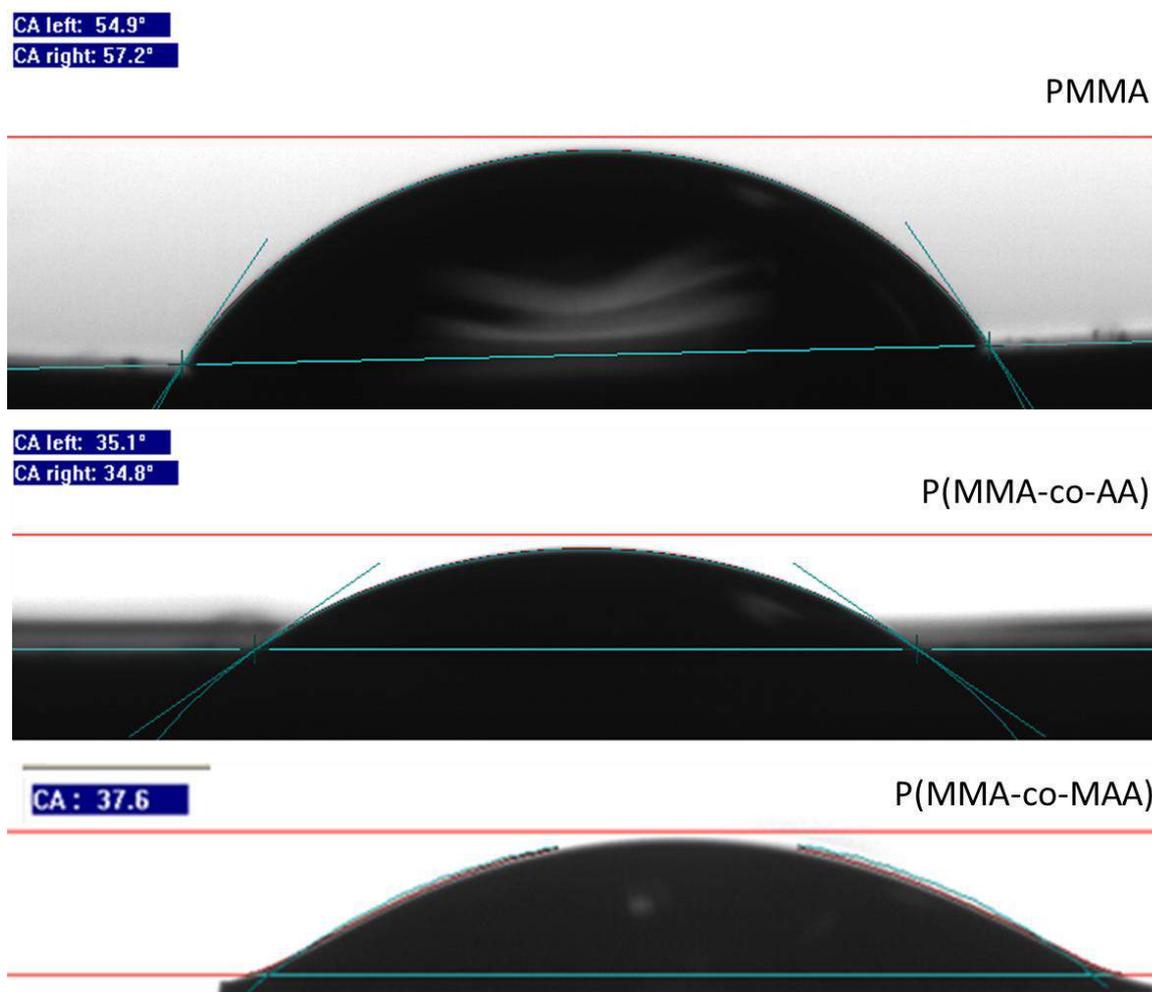


Figura 4.10: Medidas de ângulo de contato para amostras de PMMA (R01) e P(MMA-co-AA) (R04) e P(MMA-co-MAA) (R13).

Para condução da avaliação por RMN, apresenta-se na Figura 4.11 a estrutura química esperada para os copolímeros formados, sendo indicados também os átomos de hidrogênios avaliados.

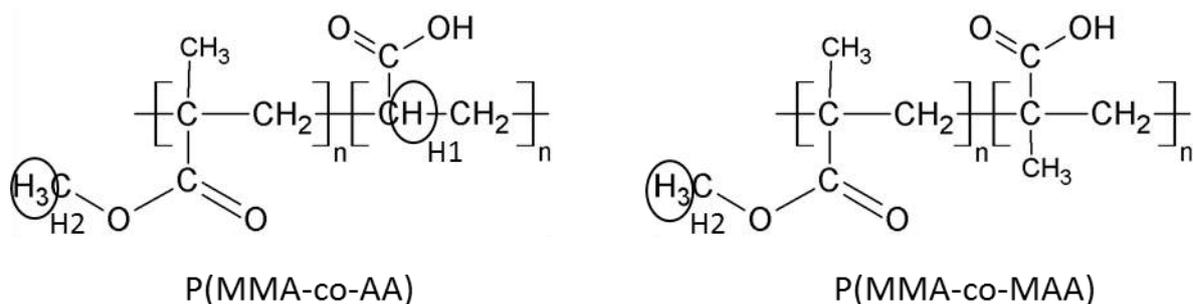


Figura 4.11: Estrutura química dos copolímeros P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA).

Na Figura 4.12 são apresentados os espectros de H-RMN para o homopolímero de PMMA e para os copolímeros de P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA) produzidos com o iniciador KPS. Foram realizados ensaios para os demais copolímeros produzidos, cujos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN são apresentados no APÊNDICE G. A análise dos espectros foi realizada com base na literatura (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; PAVIA *et al.*, 2009) e diferenciação dos picos característicos.

No espectro do PMMA, os sinais em 0,8-1,0 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios do grupo metila, cujo deslocamento químico é influenciado pela taticidade do polímero. Nos sinais posicionados em 1,6-1,9 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo metileno, o mesmo efeito pode ser observado. Os hidrogênios do grupo O-CH₃ do PMMA são verificados em um único sinal intenso em 3,6 ppm.

Nos espectros dos copolímeros com AA e MAA notam-se os mesmos sinais já descritos, pertencentes aos grupos metila e metileno dos polímeros. Importante notar que os sinais no espectro do P(MMA-co-MMA) apresentaram aspecto diferente dos demais e que os hidrogênios referentes ao grupo O-CH₃ do PMMA não aparecem como um sinal intenso.

Os espectros obtidos sugerem que foi possível a incorporação dos comonômeros pela copolimerização, pela visualização de modificações observadas nos espectros de ¹H-RMN. No caso do AA, o aparecimento de picos em torno de 2,3-2,6 ppm, característico do hidrogênio H₁, o diferencia do homopolímero (PEIXOTO, 2013). Já o MAA não apresenta um hidrogênio específico capaz de diferenciá-lo do PMMA, como mostrado na estrutura química. Todos os grupos presentes no MAA estão também presentes no MMA. Apesar disso, é clara a modificação do espectro, o que sugere a incorporação do comonômero à estrutura do polímero.

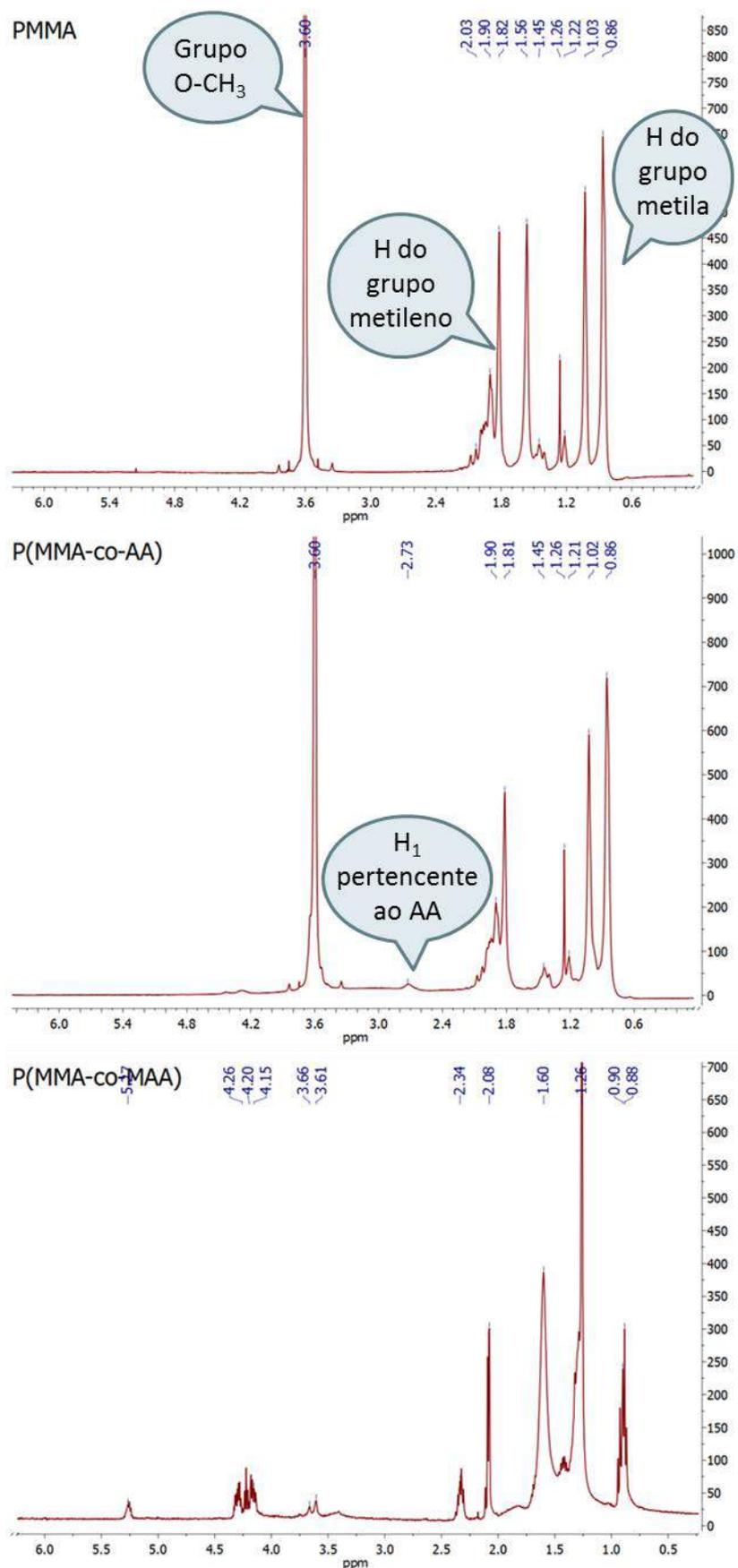


Figura 4.12: Espectros de ¹H-RMN das amostras de PMMA (R01), P(MMA-co-AA) (R04) e P(MMA-co-MAA) (R13).

O cálculo da porcentagem de comonômero incorporado foi dificultado pela similaridade entre as estruturas químicas dos monômeros utilizados e a sobreposição dos picos de H-RMN e C-RMN. Dessa forma, realizou-se um cálculo aproximado tomando como base a integração para o pico H1 (presente somente no AA) em relação ao pico H2. O copolímero produzido com iniciador PBO apresentou uma proporção de 10% em massa de incorporação. Já o sistema produzido com KPS apresentou cerca de 1% em massa de incorporação, tanto para as amostras preparadas com 7% quanto 15% de AA. O iniciador organossolúvel, PBO, favorece a copolimerização, uma vez que este já se encontra nas gotas de monômero iniciais. Dessa maneira, moléculas de AA, que se dissolvem preferencialmente na água, são incorporadas nas gotas de monômero, que absorvem o AA da água para manter o equilíbrio termodinâmico da partição. O iniciador solúvel na fase aquosa, KPS, gera poli(ácido acrílico) na fase aquosa, que dessa forma não é incorporado pelo copolímero. Além disso, os radicais formados na fase aquosa precisam vencer a barreira difusional para alcançar as gotas de monômero, onde ocorre a reação com o MMA. Para o MMA não foi possível o cálculo pela integração dos picos, já que não se observa um hidrogênio presente somente no MAA.

A porcentagem de comonômero incorporada pela copolimerização foi também calculada com base nas razões de reatividade dos monômeros MMA e AA ou MAA. De acordo com este cálculo, a porcentagem de AA incorporada foi de 32% em mol, correspondendo a 23% em massa. Para o MAA, o resultado mostrou uma incorporação de 20% em mol, o que corresponde a 17% em massa. O equacionamento encontra-se descrito no APÊNDICE H.

Diante de tudo que foi exposto, é possível comprovar o sucesso da copolimerização para a produção de nanopartículas à base de PMMA, funcionalizadas com grupos carboxílicos.

4.3 ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO CLIOQUINOL

Com o objetivo de verificar se a temperatura da reação de polimerização poderia levar à degradação do fármaco, realizou-se primeiramente um ensaio de TGA de uma amostra do clioquinol utilizado nos testes. O termograma obtido é apresentado na Figura 4.13. A temperatura de degradação do clioquinol pode ser verificada em torno de 180 °C, que é muito maior que temperatura de 80 °C utilizada nas reações, garantindo a integridade do fármaco. Dessa forma, a incorporação *in situ* do fármaco na reação parece segura.

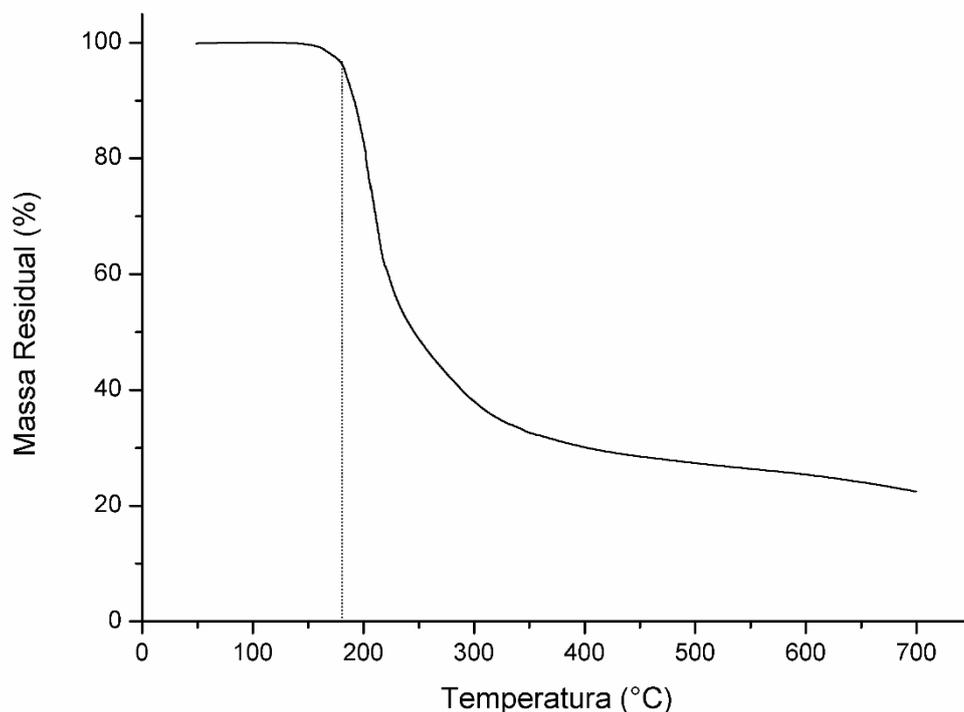


Figura 4.13: Termograma de TGA do fármaco clioquinol.

4.3.1 Estudo da concentração de fármaco nas reações de polimerização

Avaliou-se inicialmente a solubilidade do fármaco clioquinol nos monômeros MMA e AA com a variação da temperatura, conforme mostrado na Figura 4.14. Os resultados indicaram a possibilidade de utilização de uma concentração de até 5% (m/m) de clioquinol nas reações, desde que a miniemulsão fosse preparada em temperatura de 70 °C, de acordo com a análise qualitativa da solubilidade do fármaco.

De acordo com o resultado da análise de solubilidade, foram realizados ensaios de polimerização em massa para avaliar a cinética da reação com a introdução do fármaco. Os resultados até então apresentados, para as reações na ausência de fármaco, mostraram uma cinética extremamente rápida, com altas conversões nos primeiros minutos de acompanhamento da reação.



Figura 4.14: Avaliação da solubilidade do cloquinol com o aumento da temperatura.

Nos testes de polimerização em massa, na presença do cloquinol, as reações foram mais lentas, principalmente quando menor concentração de iniciador foi utilizada. Na Tabela 4.5 são apresentados os resultados de conversão para os ensaios de polimerização em massa.

Tabela 4.5: Resultados de conversão para os ensaios de polimerização em massa.

Condições	Conversão					
	Teste 01 0,5% PBO	Teste 02 1% PBO	Teste 03 2% PBO	Teste 04 0,5% AIBN	Teste 05 1% AIBN	Teste 06 2% AIBN
Branco	76,3	98,2	98,7	85,3	87,8	89,4
1 % CQ	12,3	23,1	26,8	73,5	84,0	88,5
2 % CQ	-	25,2	24,5	84,8	89,2	71,7
3 % CQ	-	-	76,3	72,3	77,7	55,2
4 % CQ	-	-	-	85,5	92,0	84,3
5 % CQ	-	-	-	84,3	84,0	89,9

As concentrações de cloquinol e iniciador foram calculadas em relação à massa de monômero.

A Figura 4.15 apresenta o aspecto dos polímeros obtidos após a polimerização em massa para cada uma das condições avaliadas. Note que na figura são mostrados os tubos referentes ao teste 02 com 3% de CQ e teste 03 com 4% e 5% de CQ que não aparecem na tabela de resultados. Nestes testes foi observada a formação de um material líquido viscoso, ou seja, presença de grande quantidade de monômero que não reagiu. As amostras obtidas nestas condições não secaram para o cálculo da conversão.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.5, para o iniciador PBO, somente com a utilização de maiores concentrações de iniciador foi possível alcançar

valores de conversão apreciáveis. Além disso, para concentrações de clioquinol superiores a 4% (m/m) não ocorreu a reação de polimerização. As amostras obtidas apresentaram coloração escura, típica de uma oxidação. Essas observações sugerem que o clioquinol exerça forte efeito de inibição da reação. O fármaco possui grupos funcionais muito reativos em sua estrutura, mostrada na Figura 2.15, como presença dos halogênios cloro e iodo e um par de elétrons livres proveniente do nitrogênio. Esses grupos podem interagir com o radical formado pelo iniciador PBO, inibindo a reação de polimerização.

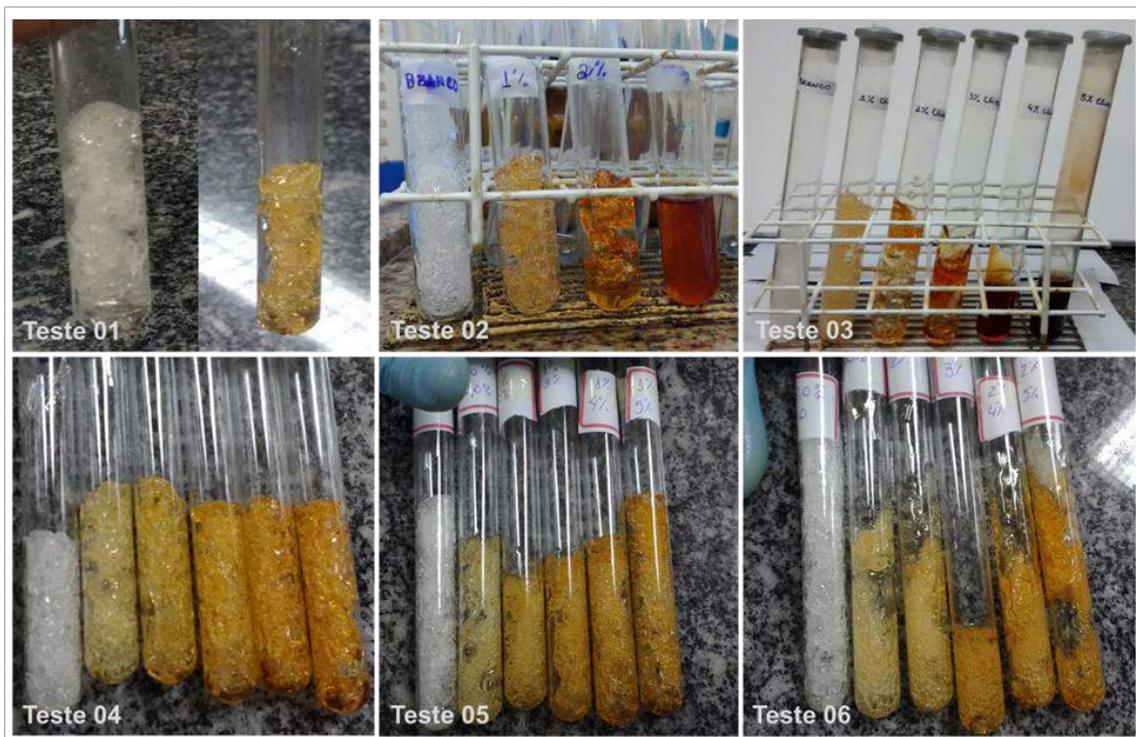


Figura 4.15: Aspecto dos polímeros obtidos por polimerização em massa.

Em relação ao iniciador AIBN, o efeito de inibição é menos pronunciável, não sendo observado pelos resultados de conversão e aspecto dos polímeros obtidos. O fármaco parece não reagir com o iniciador, permitindo a polimerização. Uma possível explicação para este comportamento é que o iniciador AIBN é mais reativo que o iniciador PBO, visto suas constantes de dissociação (K_d). Na temperatura de 70 °C, o AIBN apresenta $K_d = 3,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e o PBO apresenta $K_d = 2,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, na temperatura de 78 °C (BRANDRUP *et al.*, 1999). Dessa forma, a utilização do AIBN permitiria o avanço mais rápido e eficiente da reação. De fato, este não é o único fator a controlar o processo, dado que a reação ainda sim poderia prosseguir mesmo que de forma mais lenta. Por razões não completamente compreensíveis, o AIBN é muito menos sensível a adição de cargas orgânicas funcionalizadas no meio, como observado por RODRIGUES (2017). Este aspecto da tecnologia ainda precisa ser melhor estudado em

trabalhos futuros. Deve-se ressaltar que o iniciador AIBN não foi usado nos testes em miniemulsão e que efeitos inibitórios não foram observados em dispersões aquosas iniciadas por KPS. O uso de PBO e AIBN nos testes de polimerização em massa foi necessário devido à baixíssima solubilidade do KPS no meio orgânico, ficando evidenciado, no entanto, a importância do sistema de iniciação para a reação conduzida na presença do clioquinol.

Após a avaliação da cinética da reação contendo clioquinol pela polimerização em massa, deu-se prosseguimento aos ensaios de polimerização em miniemulsão, conduzidos com KPS como iniciador. Foram conduzidos ensaios em todas as condições determinadas. Porém, a reação foi finalizada, ou seja, produzindo látex estável, somente quando o clioquinol foi utilizado na concentração de 1% (m/m). As demais reações propostas não funcionaram. Verificou-se a formação de precipitados e endurecimento, escurecimento do sistema e separação de fases, como mostrado na Figura 4,16. Nestes casos, o clioquinol parece ter agido simultaneamente como inibidor da reação e como um agente de superfície, desestabilizando o sistema.

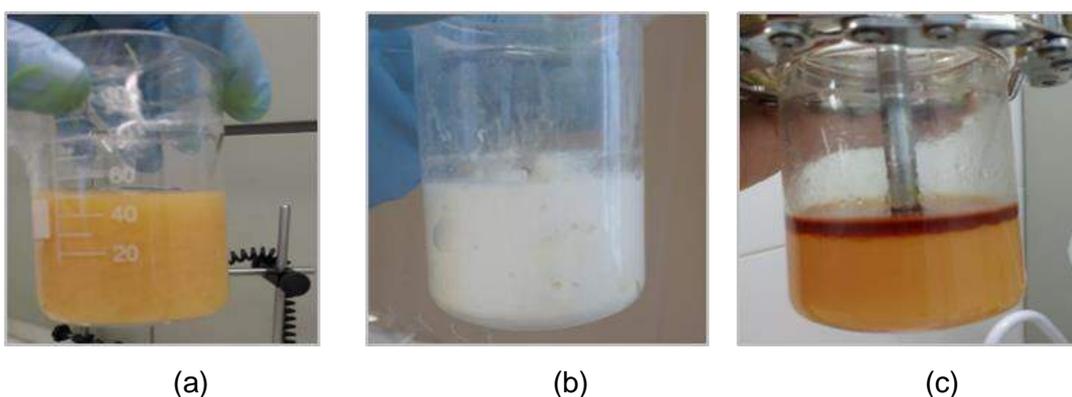


Figura 4.16: Aspecto das reações em miniemulsão com a adição de diferentes concentrações de CQ, sendo (a) amostra com coloração escura e presença de aglomerados, (b) amostra com grandes aglomerados e (c) amostra com coloração escura e separação de fase.

Com o objetivo de inferir a respeito da estabilidade das emulsões precursoras da polimerização, foram realizadas medidas de tensão interfacial ao longo do tempo. Foram avaliadas amostras dos monômeros MMA e AA, na presença e ausência de clioquinol, e também da fase aquosa, na presença e ausência de surfactante. As medidas foram tomadas na temperatura ambiente, utilizando o goniômetro com o método da gota pendente e na temperatura de 70 °C, utilizando o tensiômetro com o método da placa de Wilhelmy. Na temperatura ambiente, somente foi possível avaliar a tensão interfacial para amostras contendo 1% (m/m) de clioquinol, uma vez que nas demais

concentrações o clioquinol precipitava, como mostrado na Figura 4.17. Já na temperatura de 70 °C, todas as concentrações de clioquinol avaliadas permitiram a completa solubilização.

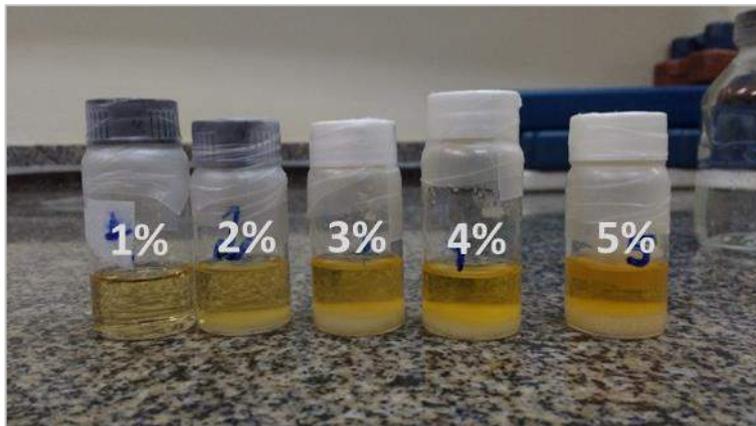


Figura 4.17: Amostras para medidas de tensão interfacial. Formação de precipitado em temperatura ambiente para amostras com concentração de 2 a 5% (m/m).

A Figura 4.18 apresenta o comportamento da tensão interfacial ao longo do tempo para as amostras avaliadas, em temperatura ambiente (Figura 4.18 A) e na temperatura de 70 °C (Figura 4.18 B).

O primeiro gráfico mostra que o surfactante SDS atua diminuindo a tensão interfacial e garantindo maior estabilidade ao sistema, como já esperado. A inserção do clioquinol na concentração de 1% (m/m) pareceu não alterar a dinâmica do sistema, uma vez que os valores obtidos na presença e ausência do fármaco foram muito semelhantes. Quando o surfactante não foi utilizado, observou-se pequeno aumento da tensão interfacial quando o clioquinol estava presente. Apesar deste aumento nos valores da tensão interfacial, não foi observada qualquer interferência significativa do fármaco na concentração de 1% (m/m) sobre a estabilidade do sistema, que indicasse que o fármaco possa atuar como um agente de superfície. Ao comparar os dois gráficos, observa-se que a temperatura diminui a tensão interfacial. Este comportamento é comum para amostras líquidas, pois o aumento da temperatura causa a diminuição das forças de atração entre as moléculas, reduzindo a tensão de superfície. O aumento da concentração de clioquinol leva a um aumento crescente dos valores de tensão interfacial, como mostrado na Figura 4.18B. Esta tendência crescente é devida ao efeito da solubilização do fármaco em maiores temperaturas. Observa-se no segundo gráfico que os valores obtidos foram semelhantes para todas as amostras, exceto para a amostra contendo o clioquinol na concentração de 4% (m/m). O resultado obtido para esta amostra foge do padrão encontrado para as demais, não sendo considerado na

análise. É possível que em concentrações elevadas o fármaco altere as propriedades superficiais do sistema, sendo necessário também realizar medidas para o clioquinol puro. No entanto, não parece ser possível afirmar, pelas medidas de tensão interfacial, que o fármaco tenha atividade de agente de superfície.

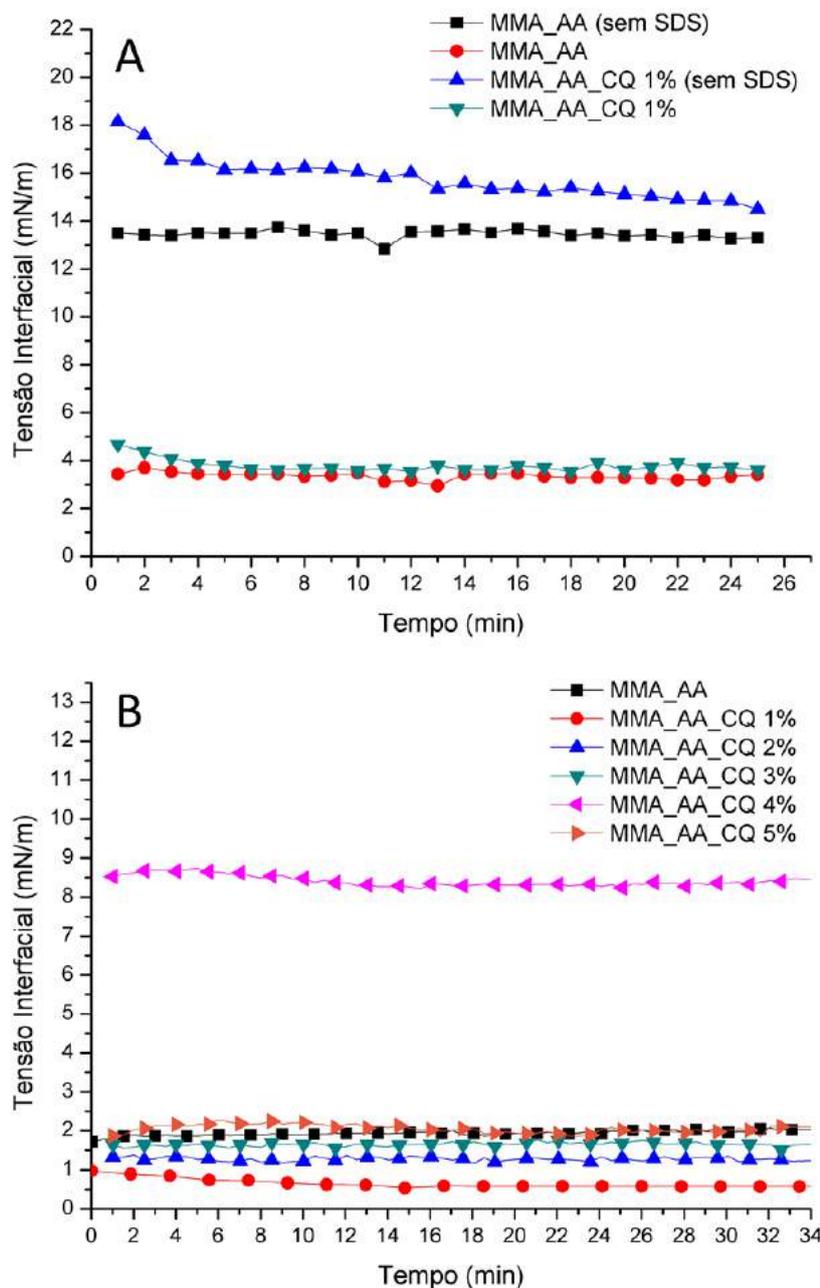


Figura 4.18: Tensão interfacial ao longo do tempo, sendo (A) medidas realizadas em temperatura ambiente e com fase aquosa contendo ou não surfactante; e (B) medidas tomadas na temperatura de 70 °C para amostras com surfactante e clioquinol nas concentrações de 1 a 5% (m/m).

Com o objetivo de estudar o comportamento dos sistemas quando maiores concentrações de clioquinol foram utilizadas, realizaram-se ensaios de H-RMN e determinação das distribuições de massas molares para as amostras.

Na Figura 4.19 apresentam-se os espectros de H-RMN do clioquinol e das amostras produzidas em massa com os iniciadores PBO e AIBN. São mostrados na figura os espectros obtidos para as amostras do teste 03 produzida com 2% de iniciador PBO e 3% de CQ e teste 06 produzida com 2% de iniciador AIBN e 5% de CQ. Para melhor comparação, é mostrada também a região de 0-2,8 ppm do espectro do polímero P(MMA-co-AA). No espectro do fármaco podem-se diferenciar os sinais característicos da molécula do clioquinol, principalmente em 7,6 ppm, relativo aos hidrogênios do anel aromático, e na região em 8,5-8,9 ppm, relacionados aos hidrogênios do anel que contém o nitrogênio (PAVIA *et al.*, 2009). Os espectros seguintes apresentam os sinais característicos dos polímeros, como já anteriormente descrito. Estes sinais são observados em 0,8-1,0 ppm, atribuídos aos hidrogênios do grupo metila, e 1,6-1,9 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo metileno. O sinal verificado em 3,6 ppm refere-se aos hidrogênios do grupo O-CH₃ do polímero. Além disso, em 2,76 ppm observa-se o pico referente ao hidrogênio específico do ácido acrílico. Os sinais verificados na região de 4,5-6,0 ppm podem ser atribuídos aos iniciadores utilizados na reação (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; PAVIA *et al.*, 2009). Os sinais característicos do clioquinol adicionado aos materiais aparecem como picos com intensidade reduzida, embora ainda seja possível distingui-los, na região de 7,5 a 9 ppm, confirmando a incorporação do fármaco.

As massas molares das amostras produzidas pelos ensaios de polimerização em massa foram também determinadas com o objetivo de identificar efeitos cinéticos das reações e são apresentadas na Tabela 4.6, juntamente com os índices de polidispersão. As curvas de distribuição de massas molares são mostradas no APÊNDICE E.

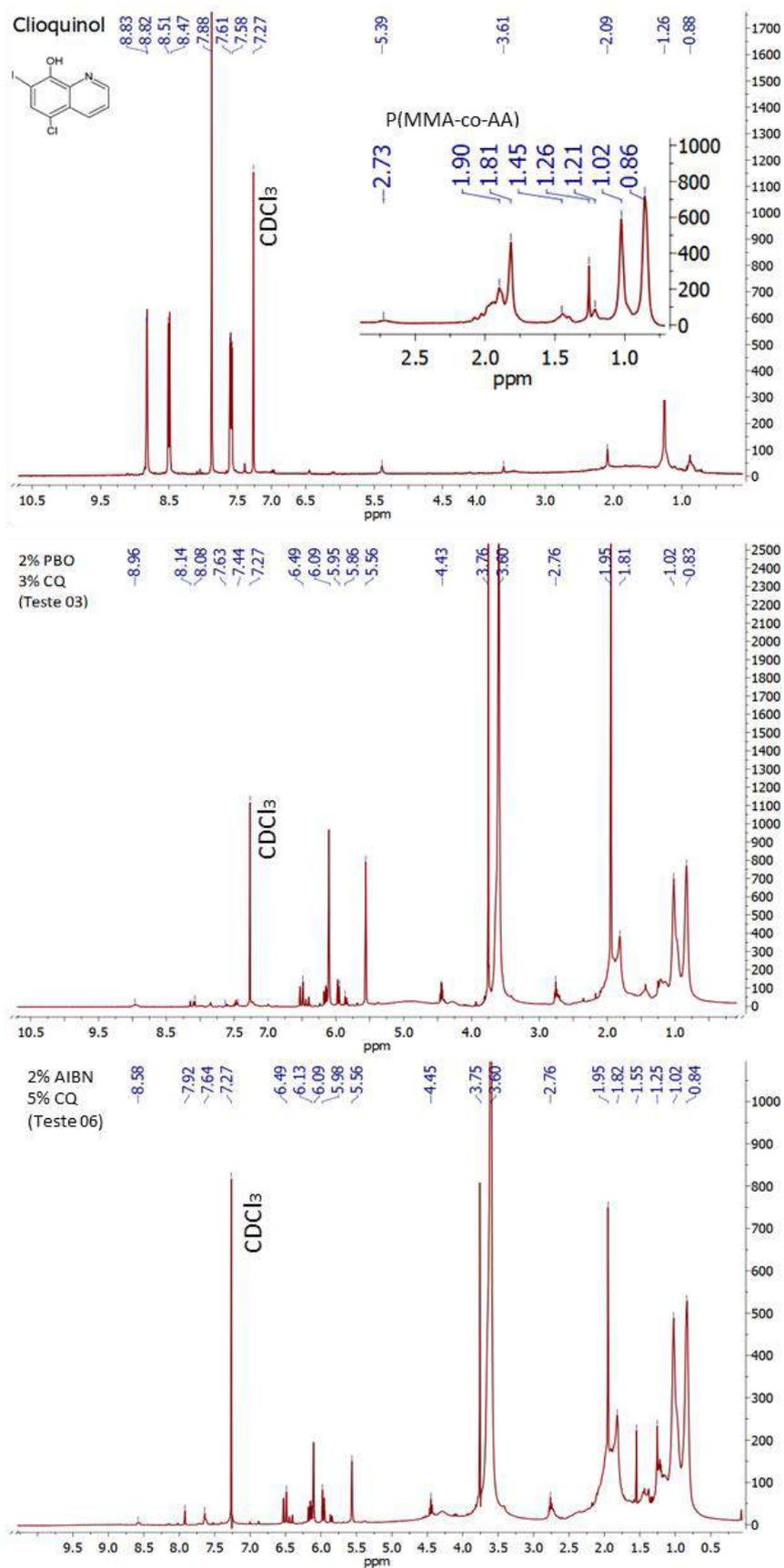


Figura 4.19: Espectros de H-RMN do clioquinol, e P(MMA-co-AA) CQ produzidas em massa.

Tabela 4.6: Massa molares médias (Mw) e índice de polidispersão (IP) para amostras produzidas por polimerização em massa.

Condições		Mw (kDa)	IP
Teste 02 1% PBO	Branco	108,3	2,95
	1 %	60,0	2,85
	2 %	98,9	2,19
Teste 03 2% PBO	Branco	52,4	2,67
	2 %	34,9	1,71
	3 %	39,8	1,75
	4 %	25,6	1,64
Teste 04 0,5% AIBN	Branco	65,7	2,65
	1 %	114,3	2,32
	2 %	139,8	2,78
	3 %	100,4	1,91
	4 %	107,6	2,42
	5 %	89,4	2,03
Teste 05 1% AIBN	Branco	57,8	2,13
	1 %	45,3	1,84
	2 %	42,4	1,84
	3 %	53,4	2,00
	4 %	58,9	1,88
	5 %	55,3	1,87
Teste 06 2% AIBN	Branco	30,2	1,96
	1 %	30,9	2,00
	2 %	31,6	1,91
	3 %	35,1	1,90
	4 %	28,8	1,86
	5 %	29,4	1,74

As massas molares dos polímeros produzidos por polimerização em massa são muito menores que as massas molares obtidas para as amostras em miniemulsão. Quanto ao índice de polidispersão, foram obtidos valores sempre muito semelhantes aqueles obtidos para as polimerizações em miniemulsão, variando entre 1,7 a 3. Verifica-se que, na presença do iniciador PBO, a massa molar do polímero diminuiu com a adição do fármaco. Este resultado complementa os dados anteriormente obtidos e corrobora a hipótese de que o clioquinol atua como um inibidor da reação ou como um agente de transferência de cadeia. Já para as reações na presença do iniciador AIBN não foram observadas alterações significativas nos valores das massas molares, de maneira que o clioquinol não afeta a reação nestas condições.

Em vista dos resultados obtidos, optou-se pela utilização de 1% (m/m) de clioquinol para a produção das nanopartículas, pois nessa concentração as reações preliminares apresentaram melhores resultados e foi possível a solubilização do

fármaco em temperatura ambiente, o que favorece as condições de trabalho. Outras composições não permitiram a solubilização completa do fármaco nos monômeros e produziram produtos instáveis, utilizando iniciador KPS, como mostrado nos resultados anteriores. É possível que se o iniciador AIBN fosse usado, a carga de clioquinol poderia ser aumentada, uma vez que os resultados de polimerização em massa indicaram que o fármaco não altera apreciavelmente a dinâmica da reação.. Apesar da quantidade de clioquinol ser pequena, este valor é suficiente para a dose requerida do fármaco no organismo. Segundo RITCHIE *et al.* (2003), nos estudos clínicos com o clioquinol foram utilizadas formulações orais em doses entre 250-750 mg/dia, sendo que a concentração do composto ativo no cérebro situou-se entre 100-200 nmol/L ($3-6 \times 10^{-5}$ g/L). Nas nanopartículas produzidas, a massa de clioquinol encapsulada seria de cerca de 2 mg/g de látex, sendo que uma medida de 200 mL de látex já iria conter cerca de 400 mg do fármaco.

4.3.2 Avaliação do tamanho de partícula e potencial zeta

O fármaco clioquinol (CQ) foi adicionado à fase orgânica da receita experimental utilizada durante as reações, na proporção de 1% em massa em relação ao monômero. A Figura 4.20 apresenta o aspecto visual da mistura formada pelo fármaco e os monômeros MMA e AA, a interface O/A e a pré-emulsão obtida após agitação magnética das fases. A coloração amarela observada na mistura é devida ao fármaco, que apresenta cor amarelo palha.

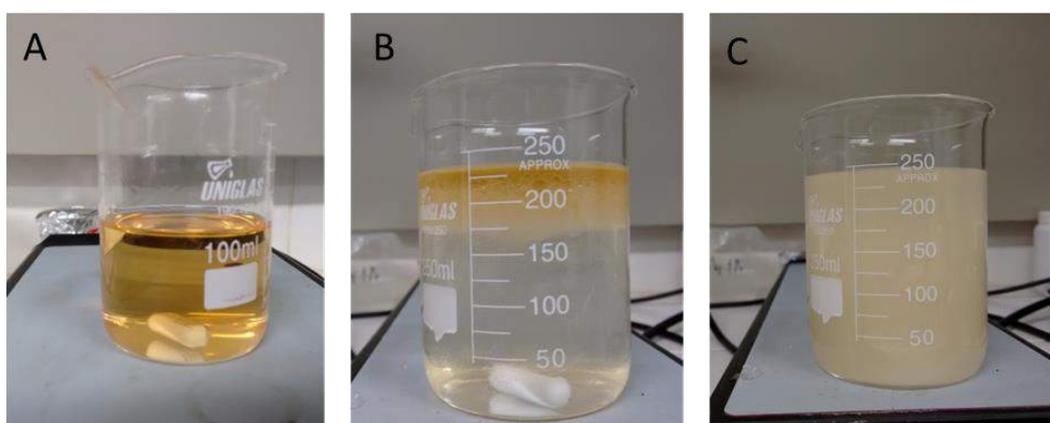


Figura 4.20: Aspecto visual do sistema formado com o fármaco clioquinol, sendo (A) a solubilização do fármaco no monômero, (B) a interface O/A e (C) a pré-emulsão obtida após agitação magnética.

As partículas obtidas após a polimerização e encapsulamento do clioquinol apresentaram tamanhos médios próximos aos das partículas de PMMA e copolímeros já apresentados, como mostrado na Tabela 4.7. Observa-se que o tamanho da partícula contendo fármaco é menor que o das partículas dos respectivos copolímeros. Isto pode ser atribuído às interações químicas entre os grupos funcionais polares da molécula de clioquinol (Figura 2.15) e das cadeias de polímero, que pode modificar a distribuição de cargas e grupos químicos nas superfícies das partículas. Os valores de potencial zeta mostraram-se semelhantes, como esperado, visto que esta propriedade é majoritariamente determinada pela presença do surfactante na interface. Pode-se concluir que, contrariando a expectativa causada pela estrutura multifuncional do fármaco clioquinol (Figura 2.15), sua presença na concentração utilizada (1% m/m) exerce pouca influência no andamento da reação.

Tabela 4.7: Resultados de tamanho, PDI e potencial zeta para as nanopartículas produzidas na presença do clioquinol.

Amostra	Reação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
* PMMA	R06	57	0,07	-54
	R07			
* P(MMA-co-AA)	R08	99 ± 11	0,13 ± 0,02	-53 ± 4
	R09			
	R10			
P(MMA-co-AA) CQ	R11	61 ± 2	0,12 ± 0,04	-58 ± 6
	R12			
	R13			
P(MMA-co-MAA)	R14	80 ± 3	0,247 ± 0,005	-60 ± 7
	R15			
P(MMA-co-MAA) CQ	R16	57,6	0,140	-48,9

*Os dados da Tabela 4.3 são novamente reportados para fins de comparação. Os valores indicados para os copolímeros são referentes a três reações, sendo reportados como média ± desvio padrão.

A Figura 4.21 apresenta as distribuições de tamanho obtidas para as réplicas contendo o fármaco para os dois copolímeros produzidos. Novamente as distribuições obtidas foram bastante semelhantes, o que mostra a reprodutibilidade do processo de produção das partículas.

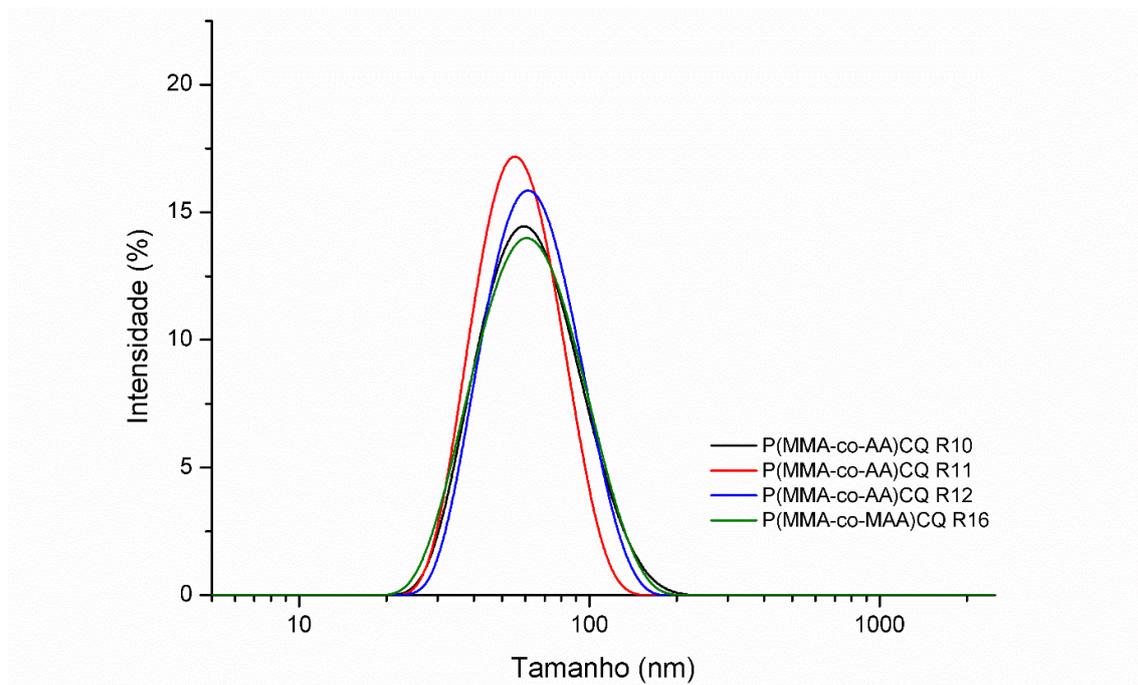


Figura 4.21: Distribuição de tamanhos para as amostras contendo o fármaco.

4.3.3 Conversão e massa molar

Nos testes anteriores de copolimerização, observou-se que a conversão das reações atingia o ponto máximo nos primeiros minutos, não sendo necessário o acompanhamento por 2 horas. Dessa forma, optou-se por diminuir o tempo de reação para os ensaios com o fármaco a 1 hora. A conversão das reações contendo o clioquinol foram também acompanhadas e a curva obtida é apresentada na Figura 4.22. Nesta figura é apresentada também a curva de conversão para a amostra de PMMA, sendo considerada a reação até 60 minutos. Observa-se que a adição do fármaco ao sistema não resultou em alteração significativa da dinâmica da reação de copolimerização, mesmo quando o AA ou MAA foram utilizados, uma vez que a conversão máxima foi também atingida nos primeiros minutos, como nos casos anteriores. Em comparação com o homopolímero PMMA, novamente observa-se um pequeno atraso na reação nos dois casos.

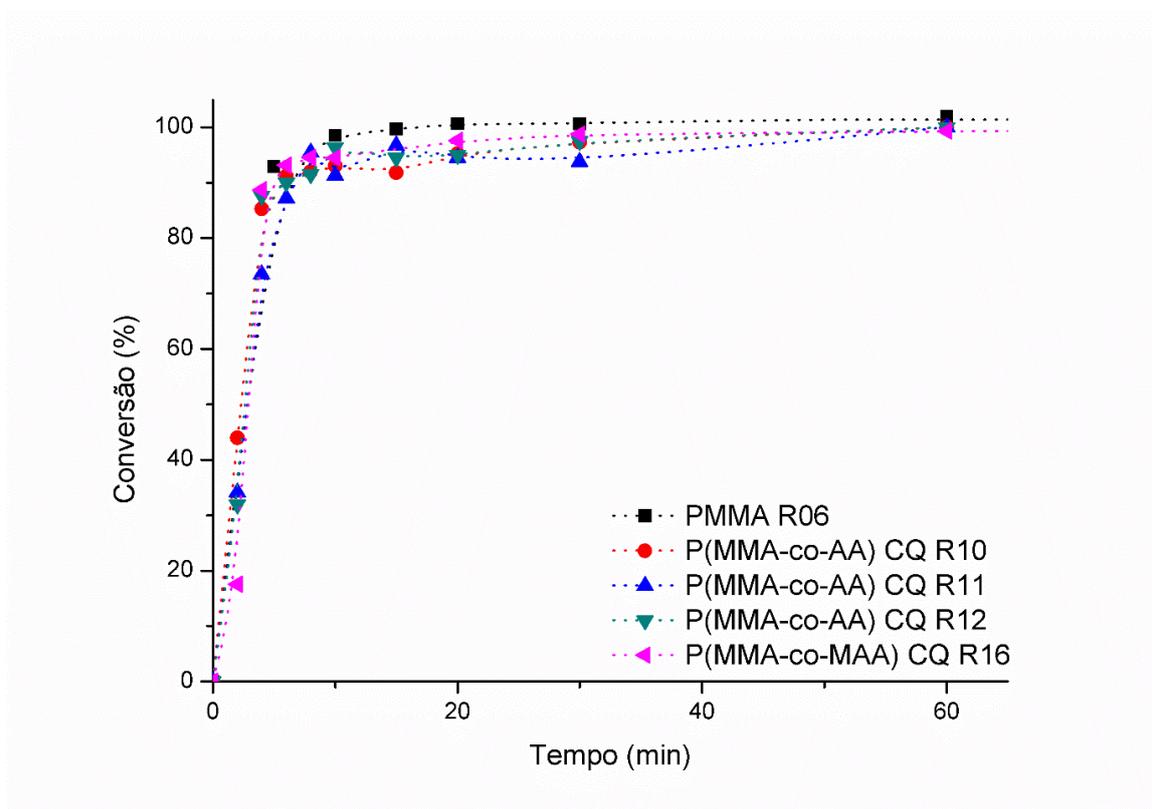


Figura 4.22: Curvas de conversão para as reações contendo o fármaco.

Em relação às distribuições de massas molares, a reação atingiu a massa molar final nos primeiros minutos de reação, como mostrado na Figura 4.23. Este resultado corrobora os resultados de conversão obtidos, mostrando que a adição do fármaco na concentração de 1% não afeta o andamento da reação.

O P(MMA-co-AA) contendo clioquinol apresentou massa molar média de 1600 ± 500 kDa, e IP de $1,9 \pm 0,3$, que é similar ao do copolímero anteriormente descrito, com massa molar média de 1800 ± 500 kDa e IP de $1,9 \pm 0,7$. Para a amostra de P(MMA-co-MAA) com clioquinol a massa molar foi verificada em 1420 kDa, com IP de 2,2. Os valores são também próximos ao copolímero, que apresentou massa molar média de 1600 ± 200 e IP de $3,1 \pm 0,8$. As distribuições obtidas para as demais amostras com clioquinol são apresentadas no APÊNDICE E.

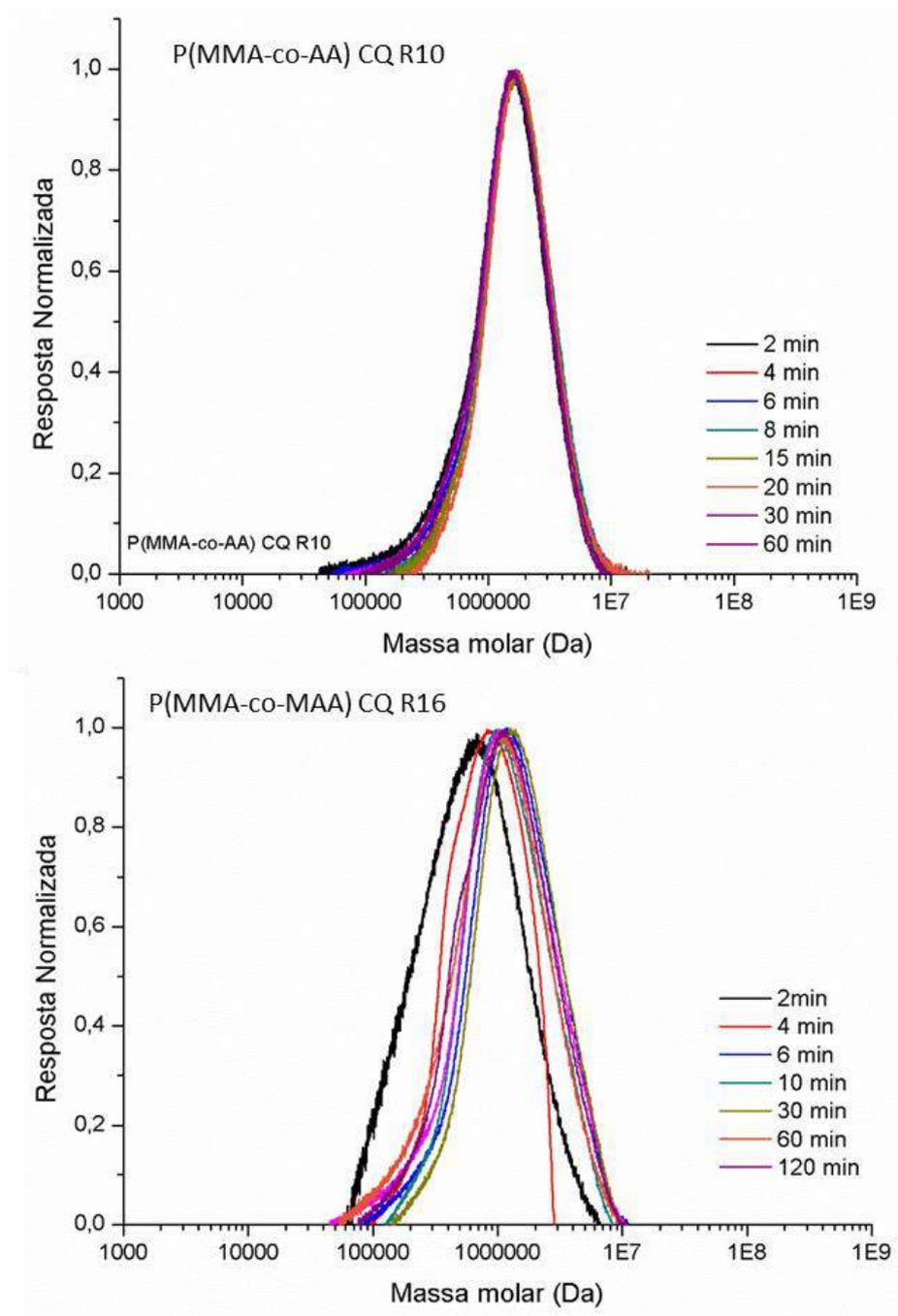


Figura 4.23: Distribuições de massas molares para P(MMA-co-AA) dopado com clioquinol, da reação R10.

4.3.4 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

As nanopartículas contendo clioquinol foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão para observação da morfologia, verificação dos tamanhos

médios de partícula e possível presença de cristais de fármaco dispersos no meio. Na Figura 4.24 são apresentadas as imagens obtidas pelo MET, que confirmam os resultados anteriormente obtidos para as partículas do copolímero. Apesar da baixa qualidade, as imagens mostram partículas esféricas, com diâmetros de aproximadamente 60 nm, confirmando os tamanhos médios obtidos por espalhamento de luz. Não foram realizadas imagens para as partículas de P(MMA-co-MAA).

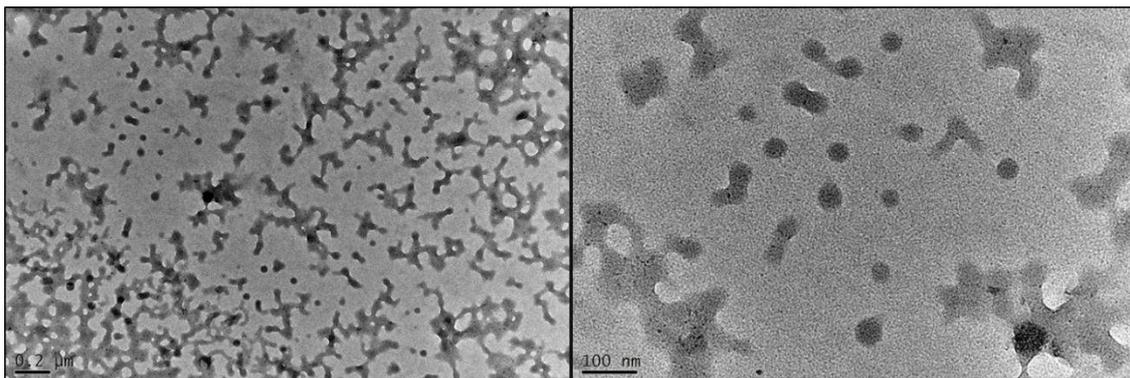


Figura 4.24: Imagens de MET das nanopartículas de P(MMA-co-AA) (R10).

4.3.5 Análises térmicas

Os resultados das análises térmicas de DSC e TGA das amostras contendo o fármaco possibilitaram comparar o material em termos da temperatura de transição vítrea e da temperatura de degradação, em relação às nanopartículas de PMMA e dos respectivos copolímeros. Apresentam-se na Figura 4.25 o termograma de TGA para as amostras contendo clioquinol. Nesta mesma figura são novamente representados os resultados obtidos para os polímeros anteriormente descritos para facilitar a comparação. O termograma de DSC é apresentado no APÊNDICE F.

De acordo com o ensaio de DSC, a Tg da amostra com clioquinol foi de 108 °C. Resultado semelhante foi encontrado para as partículas na ausência do fármaco, como já mencionado. A ausência de pico referente à fusão do clioquinol, a despeito de concentração baixa, indica que o fármaco está disperso na matriz.

O perfil de degradação do material com clioquinol encapsulado foi também semelhante àquele obtido para o copolímero. Inicialmente tem-se uma pequena perda de massa, por volta de 200 °C, seguida pela completa degradação, iniciada em 350 °C para as amostras com AA e em 380 °C para a amostra com MAA, assim como característico dos polímeros P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA).

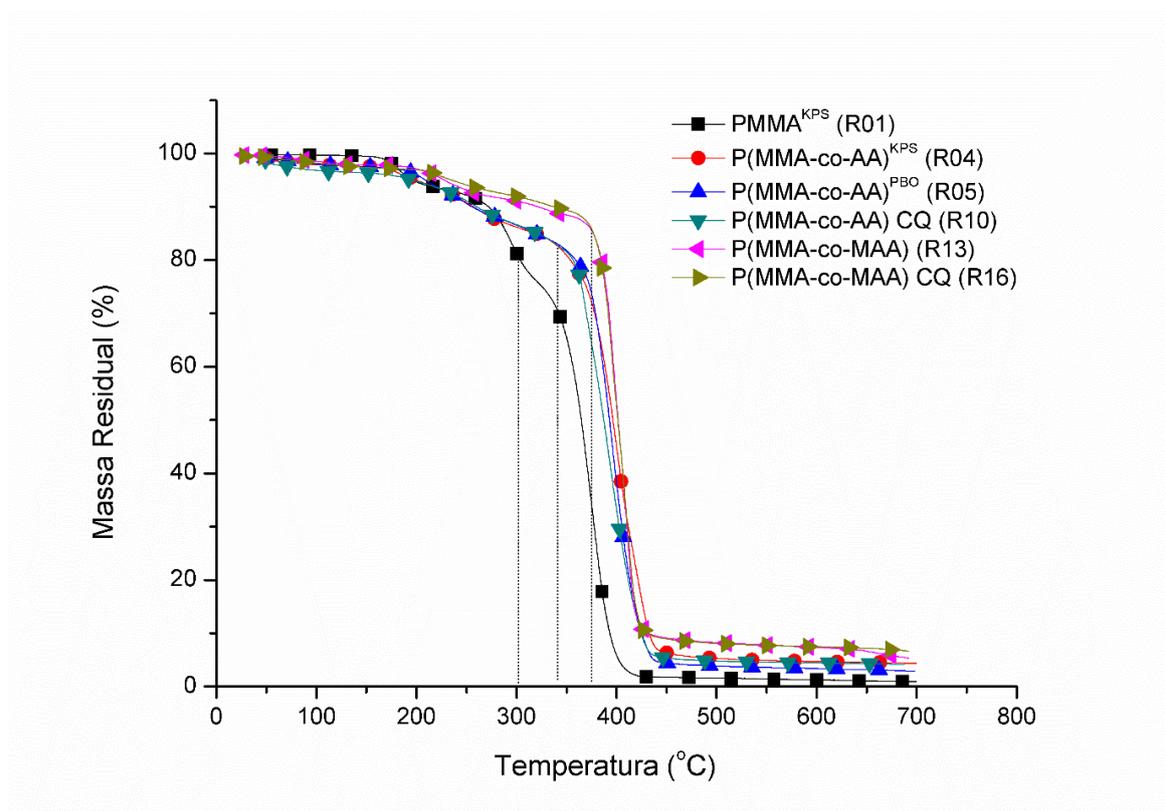


Figura 4.25: Termogramas de TGA obtidos para as amostras.

Os resultados das análises térmicas para as amostras sintetizadas são resumidos na Tabela 4.8. Como mostrado, em relação à caracterização térmica, a inclusão do fármaco no processo de polimerização também não parece alterar as propriedades térmicas do material produzido.

Tabela 4.8: Resultados análises térmicas.

Amostra	Reação	Temperatura de transição vítrea (°C)	Temperatura de máxima degradação (°C)
PMMA	R01	123	300
P(MMA-co-AA) ^{KPS}	R04	106	350
P(MMA-co-AA) ^{PBO}	R05	111	350
P(MMA-co-AA) CQ	R10	108	350
P(MMA-co-MAA)	R13	137	380
P(MMA-co-MAA) CQ	R16	_na	380

^{KPS} Material produzido com iniciador KPS; ^{PBO} Material produzido com iniciador PBO.

Realizou-se ainda um ensaio de DSC, constituído apenas da primeira etapa de aquecimento das amostras, para avaliação do encapsulamento do fármaco e de possíveis interações com o polímero, como mostrado na Figura 4.26. A curva de DSC do clioquinol mostra um pico endotérmico em 180 °C, que corresponde à temperatura de fusão do fármaco. Ao contrapor os termogramas de TGA e DSC do fármaco, nota-se que a temperatura de degradação e de fusão do composto são similares. Este fenômeno não é muito comum na literatura; porém, para o clioquinol este resultado está de acordo com as suas especificações (PubChem, 2015). Para a mistura física das nanopartículas com o clioquinol, na razão de 1:1, verifica-se o pico de fusão do fármaco na mesma temperatura de 180 °C, como esperado, já que o fármaco se encontra como uma fase segregada. A curva obtida para as nanopartículas não apresentou qualquer evento térmico nessa região. O desaparecimento do pico endotérmico do clioquinol pode ser atribuído ao aprisionamento e dispersão das moléculas do fármaco nas nanopartículas, evitando a formação de cristais. Dessa forma, pode-se admitir que o fármaco encontra-se encapsulado e homogeneamente disperso na matriz polimérica.

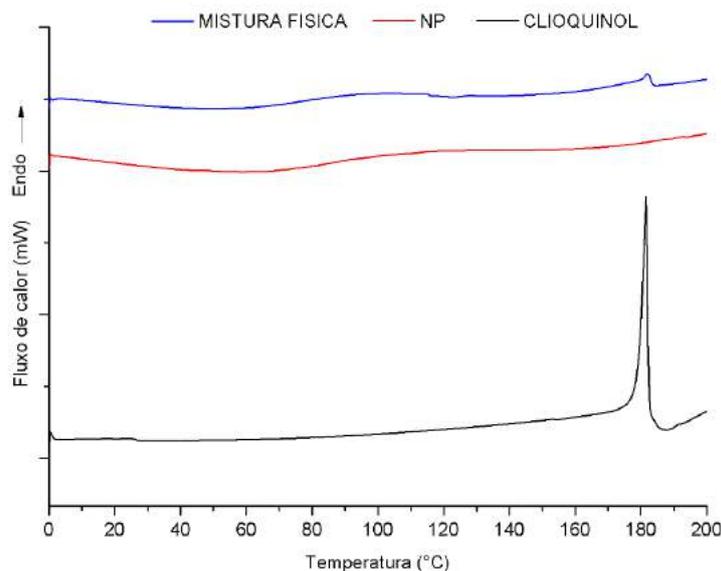


Figura 4.26: Termograma de DSC para avaliação da encapsulamento do fármaco clioquinol.

4.3.6 Espectros de RMN

Foram realizadas análises de H-RMN da amostra contendo o fármaco com o objetivo de verificar os sinais característicos do clioquinol. A Figura 4.27 apresenta o

espectro obtido, em conjunto com o espectro do clioquinol e uma região do espectro do P(MMA-co-AA) anteriormente reportada.

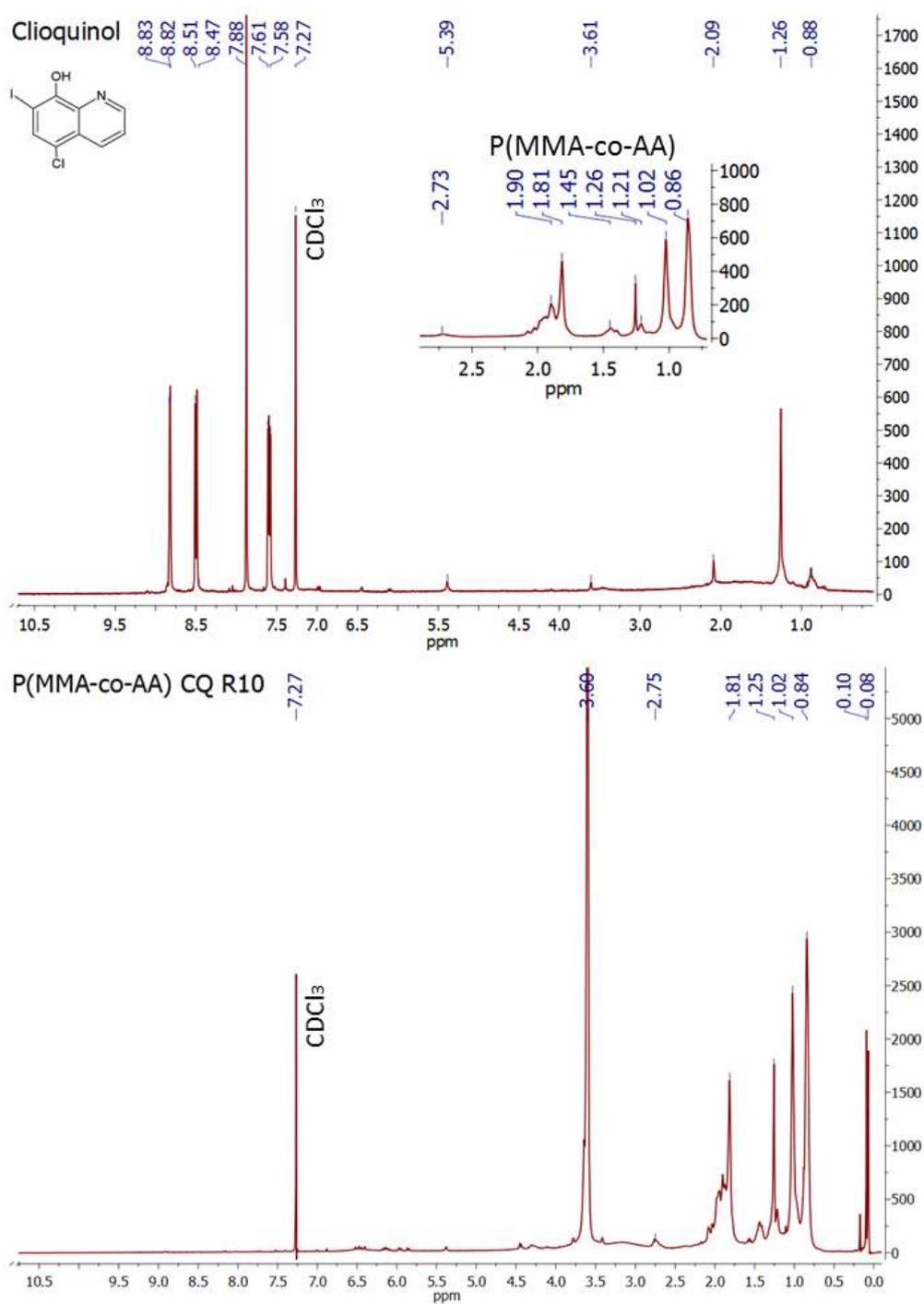


Figura 4.27: Espectro de H-RMN de P(MMA-co-AA) CQ produzido em miniemulsão.

Os sinais característicos do polímero podem ser verificados na região de 0,8-1,9 ppm referentes aos hidrogênios alifáticos dos grupos metila e metileno. Em 2,7 ppm

pode-se observar o hidrogênio pertencente ao ácido acrílico. Além disso, os hidrogênios do grupo O-CH₃ aparecem como um sinal intenso em 3,6 ppm, como anteriormente discutido (PAVIA *et al.*, 2009). Os sinais característicos do fármaco, que deveriam surgir entre 7,5-8,8 ppm não são visualizados no espectro da amostra produzida em miniemulsão. Como o fármaco encontra-se encapsulado, esperava-se verificar os sinais menos intensos. Porém, é possível que devido à baixa concentração do composto (1% m/m) na amostra, este não tenha se evidenciado.

4.3.7 Eficiência de encapsulamento do fármaco clioquinol

O cálculo do teor de clioquinol associado às nanopartículas foi realizado a partir de análises em espectrofotômetro UV-VIS pelas técnicas direta (extração em solvente) e indireta (dosagem do clioquinol no sobrenadante separado por filtração/centrifugação em membrana). Inicialmente definiu-se o pico de absorção máxima do clioquinol em etanol, para a técnica de extração, e em meio aquoso contendo surfactante, para a técnica de filtração e centrifugação em membrana. Em ambos os casos, o pico de absorção máxima do fármaco foi verificado em 256 nm, conforme varredura de uma solução padrão 0,1 g/L. Os espectros de varredura definidos para as duas análises são apresentados no APÊNDICE I, bem como as curvas de calibração utilizadas nos cálculos.

As análises foram realizadas em duplicata para cada uma das réplicas (R10, R11 e 12) e os resultados são reportados como uma média dessas três amostras, seguido pelo desvio padrão, na Tabela 4.9. O ensaio foi também realizado para a amostra R16.

Tabela 4.9: Eficiências de encapsulamento.

Amostra	Eficiência de encapsulamento (%)	Técnica
P(MMA-co-AA) CQ	97,6 ± 0,2	Membrana 3 kDa
P(MMA-co-AA) CQ	92 ± 4	Extração
P(MMA-co-MAA) CQ	98	Membrana 3 kDa

Os resultados mostraram elevada eficiência de encapsulamento, o que já era esperado devido à lipofilicidade do fármaco utilizado. Dessa forma, pode-se admitir que o ativo é completamente dissolvido nos monômeros (MMA e AA ou MAA), evitando-se que haja migração do mesmo para a fase aquosa e consequente perda de eficiência de encapsulamento.

As duas técnicas utilizadas diferem pela grandeza avaliada para o cálculo da eficiência. Na técnica de filtração/centrifugação, a eficiência é obtida por meio de um balanço de massa, sendo medida a concentração de fármaco livre na amostra. Pela técnica de extração, a eficiência é calculada como a fração de fármaco encapsulada diretamente. Em ambas, os valores obtidos foram semelhantes, provando o resultado da eficiência de encapsulamento para as nanopartículas produzidas via miniemulsão.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

No presente capítulo foram apresentados e discutidos os resultados obtidos acerca das nanopartículas poliméricas produzidas, do homopolímero de PMMA e dos respectivos copolímeros com AA e MAA. Inicialmente estudaram-se diferentes composições experimentais para avaliar o efeito do surfactante e da carga orgânica sobre as propriedades de tamanho e carga superficial das nanopartículas. Os resultados mostraram que o surfactante é a variável que a princípio, determina o tamanho e a carga das partículas. Após este estudo preliminar, as reações seguintes em miniemulsão foram conduzidas utilizando o surfactante SDS, que fornece partículas com carga negativa. Em relação ao tamanho, as partículas apresentaram tamanhos em torno de 60 a 100 nm. Esta faixa de tamanho é adequada para aplicações no organismo. O encapsulamento do fármaco clioquinol na concentração de 1% (m/m) nas partículas foi realizado com sucesso. Com o objetivo de estudar de forma mais aprofundada os efeitos cinéticos das reações de copolimerização na presença do fármaco, foram realizados testes de polimerização em massa. Resultados interessantes foram obtidos acerca do sistema de iniciação da reação foram observados. Na presença do clioquinol, a evolução da reação é afetada quando o iniciador PBO é utilizado. Já quando o iniciador AIBN é usado, os efeitos de inibição da reação são menos pronunciáveis, de forma que este iniciador é menos sensível a carga orgânica.

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram adequados para dar prosseguimento aos testes de funcionalização das partículas.

Capítulo V

RESULTADOS E DISCUSSÃO FUNCIONALIZAÇÃO

5.1 ENSAIOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Foram realizados ensaios de funcionalização das nanopartículas por meio da imobilização da proteína BSA e do aminoácido lisina, utilizados como moléculas modelo para definição das condições experimentais para posterior adsorção do peptídeo TAT. Optou-se por explorar a técnica de imobilização pela formação de ligação covalente, utilizando o EDC para ativação dos grupos ácidos presentes nas nanopartículas.

5.1.1 Imobilização da proteína BSA

A funcionalização das nanopartículas com a proteína BSA foi realizada por meio de formação de uma ligação covalente entre o grupo ácido acrílico presente no comonômero e o grupo amino terminal da proteína, mediante ativação com EDC. A escolha desta proteína como modelo para a reação de funcionalização se deu pela sua aplicação em diversos trabalhos na área de transporte de fármacos, baixo custo e estabilidade (GELAMO *et al.*, 2002). A definição da massa inicial de BSA utilizada nos ensaios foi baseado nos resultados reportados no PEIXOTO (2013) e também no cálculo da massa requerida de proteína para formação de uma monocamada na superfície das nanopartículas. Para este cálculo, levou-se em consideração o diâmetro médio das partículas em estudo e o diâmetro da BSA, supondo uma configuração esférica da proteína. Os cálculos utilizados são apresentados no APÊNDICE J. Dessa forma, a razão mássica (BSA/NP) mínima para a formação de uma monocamada foi de 0,08. A razão mássica usada foi de 0,4; ou seja, em concentrações de BSA acima do nível mínimo requerido para formação de uma monocamada.

Foram realizados testes para as amostras do copolímero e também para o PMMA, possibilitando a comparação dos valores obtidos. A quantificação da proteína

por meio do ensaio de BRADFORD mostrou que cerca de 75% da BSA utilizada foi imobilizada em ambas as amostras, como mostrado na Tabela 5.1. Os valores apresentados nesta tabela foram calculados com base na massa de 10 mg de polímero utilizado no ensaio de funcionalização. A área específica foi calculada com base no diâmetro médio das partículas, consideradas esféricas. A área específica obtida para as partículas de PMMA (R06) foi de 111 m²/g e para as amostras de P(MMA-co-AA) (R07, R08 E R09) foi de 75 ± 24 m²/g.

Os valores obtidos para a imobilização da BSA em ambas as matrizes, PMMA ou copolímero, ficaram próximos, sendo que, quando foram utilizadas partículas de PMMA, a quantidade de BSA imobilizada foi maior em massa. Na avaliação pela área superficial disponível das nanopartículas, a relação se torna similar, uma vez que as partículas do copolímero apresentaram diâmetros maiores e áreas específicas menores.

Tabela 5.1: Quantificação de BSA imobilizada nas nanopartículas.

Amostra	Reação	BSA imobilizada (mg _{BSA} /g _{NP})	BSA imobilizada (mg _{BSA} /m ² _{NP})	% BSA imobilizada
PMMA	R06	92	0,83	77
	R07			
P(MMA-co-AA)	R08	76 ± 6	1,1 ± 0,3	71 ± 2
	R09			

Os valores indicados para o copolímero são referentes a três amostras, sendo reportados como média ± desvio padrão. Nos ensaios de adsorção foi utilizada uma massa inicial de BSA de 1 mg.

Estes resultados sugerem a possibilidade de que os grupos ácidos inseridos no polímero não se encontrem disponíveis para ligação ou ainda que outras forças não específicas, como interações hidrofóbicas e eletrostáticas, controlem o processo de adsorção. Conforme descrito por PEIXOTO (2016) esta quantidade de proteína conjugada à superfície das partículas garante a formação de múltiplas camadas de BSA.

Medidas do potencial zeta das amostras após a imobilização foram realizadas com o objetivo de verificar alguma alteração das características das partículas com a inserção da proteína. Os resultados mostraram um abaixamento significativo do potencial zeta após adsorção, conforme mostrado na Tabela 5.2, o que confirma a modificação da superfície das partículas.

Os valores de potencial zeta encontrados não ficaram próximos do potencial de -10 mV relatado por SALGIN *et al.* (2012) para a BSA em pH igual a 6,8 no meio de imobilização. Este resultado sugere que a cobertura de BSA nas partículas não foi

completa. Porém, a alteração do potencial zeta das amostras evidencia a presença da proteína na superfície das partículas em grande quantidade, visto que as cargas existentes na superfície das partículas são majoritariamente provenientes do surfactante. O abaixamento dos valores de potencial zeta também estão relacionados a formação de ligações de hidrogênio da proteína BSA.

Tabela 5.2: Comparação do potencial zeta das nanopartículas antes e após a funcionalização.

Amostra	Reação	Potencial zeta inicial (mV)*	Potencial zeta após imobilização
PMMA	R06	-54	-27,65
	R07		
P(MMA-co-AA)	R08	-53 ± 4	-20 ± 9
	R09		

*Os dados da Tabela 4.3 são reportados com o potencial zeta das partículas para fins de comparação.

Com o intuito de verificar a formação da ligação covalente pela rota química sugerida, foram realizados ensaios de FTIR das amostras iniciais, após a adição do EDC e após a imobilização da proteína. A análise se deu pela comparação dos espectros obtidos e a diferenciação de picos característicos. Na Tabela 5.3 é apresentado um resumo das principais informações fornecidas pela técnica de FTIR para a imobilização de biomoléculas nas nanopartículas (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; RIBEIRO e SOUZA, 2007; PAVIA *et al.*, 2009).

Inicialmente, apresenta-se na Figura 5.1 o espectro de FTIR da BSA, proteína modelo em estudo. A BSA é uma proteína de alta massa molar, cuja estrutura primária é constituída por cerca de 580 resíduos de aminoácidos (GELAMO *et al.*, 2002). No espectro de FTIR da BSA é possível localizar as bandas características de ligações amida, em 3300 cm⁻¹ e 1640 cm⁻¹, provenientes das múltiplas ligações de aminoácidos. Além disso, em 1550 cm⁻¹ encontra-se o pico correspondente à deformação simétrica da ligação NH₂ de aminas primárias.

Tabela 5.3: Principais bandas de FTIR associadas ao sistema estudado.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupamento característico
3500-3000	Estiramento da ligação OH da água
3300	Amida A – Estiramento da ligação NH
3100	Amida B – Estiramento da ligação NH
3200-2500	Estiramento da ligação OH de ácido carboxílico
1800-1500	Ligação C = N
1750-1670	Estiramento da ligação C = O de éster
1700-1600	Amida I – Estiramento das ligações C = O
1470-1430	Deformação angular da ligação CH ₂
1590-1550	Deformação angular simétrica da ligação NH ₂
1390-1370	Deformação angular da ligação CH ₃
1300-1050	Estiramento da ligação C-O de ésteres

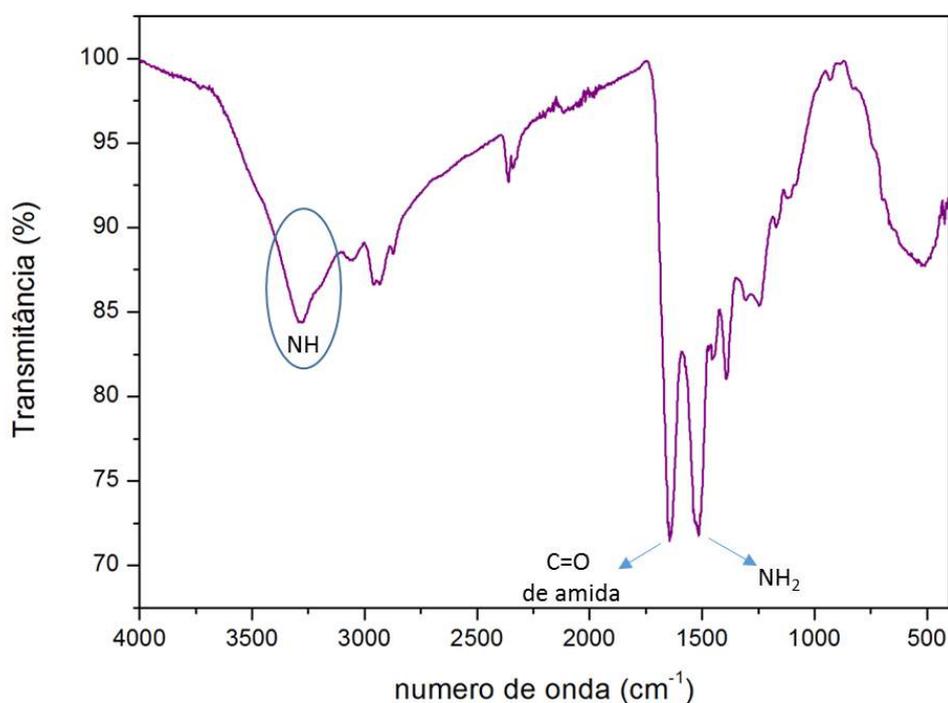


Figura 5.1: Espectro de FTIR da proteína BSA.

Na Figura 5.2 são apresentados os espectros de FTIR da amostra polimérica funcionalizada (R07). A partir destes espectros, verifica-se a existência de um pico intenso em 1716 cm⁻¹, característico da carbonila (C=O) proveniente do polímero inicial, que contém grupos ésteres e ácidos carboxílicos. No caso do ácido, encontra-se ainda

uma banda em 2950 cm^{-1} que é característica do grupo hidroxila. Além disso, o pico em 1144 cm^{-1} pode ser atribuído às ligações C-O presentes no éster. As bandas observadas na região entre 1500 e 1000 cm^{-1} referem-se à deformação angular das ligações C-H.

No espectro da amostra com EDC, observa-se o aparecimento de um sinal próximo a 1570 cm^{-1} , característico de ligações do tipo N = C, provenientes da molécula de EDC.

Para a amostra funcionalizada, esperava-se encontrar picos de absorção característicos de amidas, que caracteriza a ligação supostamente formada. Assim, em torno de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, estaria localizada a banda referente ao estiramento da ligação C=O da amida enquanto em $3100\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ estaria a banda atribuída ao estiramento da ligação NH. No espectro apresentado não se observam tais sinais (ou estes estão presentes em intensidades muito baixas, não sendo detectados).

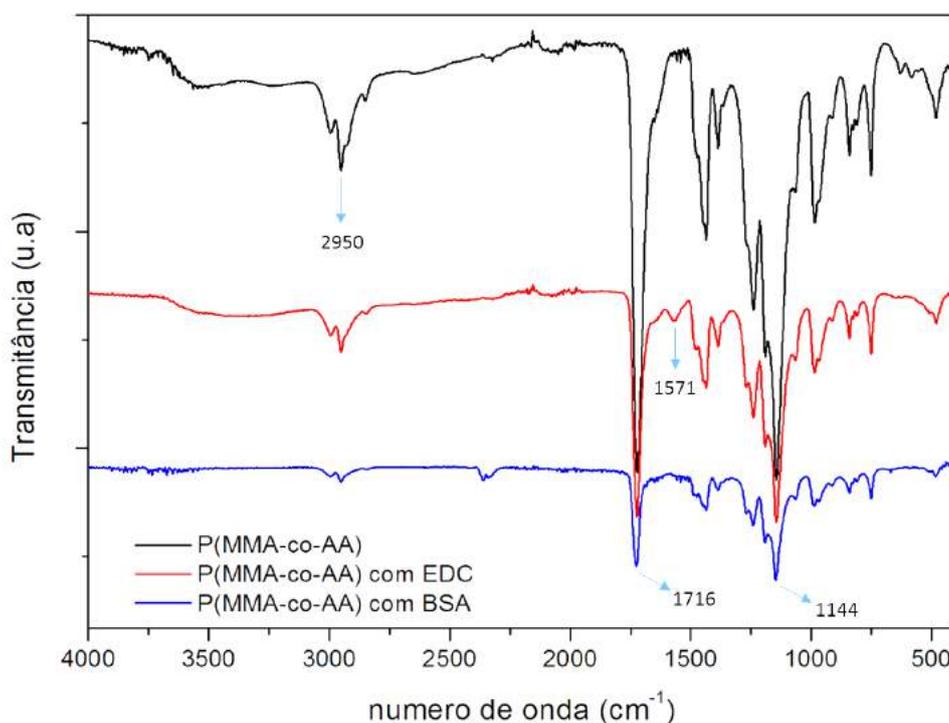


Figura 5.2: Espectros de FTIR da amostra (R07) para o ensaio de imobilização da BSA.

Como a intensidade do sinal observado da ligação amida foi muito baixa, não é possível concluir que a formação da ligação covalente esteja de fato ocorrendo. Além disso, pode ser que a proteína BSA não seja um bom modelo para estudar o comportamento do processo de funcionalização por rota química, uma vez que se trata de uma proteína de alta massa molar cujos grupos ativos podem estar envolvidos em interações de outra natureza, devido à complexa conformação da molécula. A adsorção

em grandes quantidades de BSA sobre superfícies poliméricas já havia sido reportada por outros autores (GELAMO *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; PEIXOTO, 2013). A capacidade de conjugação da proteína BSA por interações físicas pode, no entanto, ser ainda estudada e avaliada quanto a estabilidade do complexo formado.

Dessa forma, a investigação de uma segunda molécula modelo se fez necessária para garantir a verificação da ligação química pela metodologia pretendida. O TAT, peptídeo de interesse, é uma molécula que apresenta dez resíduos de aminoácidos, dentre eles a lisina, que possui um grupo amino livre, além do grupo terminal. Estes grupos amino podem ser utilizados para a reação com a porção ácida presente na superfície das nanopartículas. Com base nessas características, optou-se por explorar a imobilização da lisina nas nanopartículas produzidas como reação modelo.

5.1.2 Imobilização do aminoácido lisina

O procedimento de imobilização do aminoácido lisina foi semelhante ao anteriormente estabelecido para a proteína BSA. Por se tratar de uma molécula muito menor que a BSA, novos cálculos foram realizados, de modo que a quantidade de lisina utilizada nos ensaios de imobilização possibilitasse pelo menos a formação de uma monocamada na superfície das nanopartículas.

Neste caso, a técnica de quantificação por meio do ensaio de BRADFORD não foi adequada para estimar a quantidade de lisina imobilizada, uma vez que este é indicado para avaliação de proteínas de alta massa molar (BRADFORD, 1976). Para a quantificação da lisina, utilizou-se o reagente OPA, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.4. Neste caso, o ensaio de funcionalização foi realizado também com as partículas contendo cloquinol, utilizando uma massa de 100 mg de polímero. Novamente, a área específica foi calculada com base no diâmetro médio das partículas, consideradas esféricas.

As amostras de P(MMA-co-AA) (R07, R08 E R09) apresentaram área específica de $75 \pm 24 \text{ m}^2/\text{g}$, as amostras de P(MMA-co-AA) CQ (R10, R11 E R12) apresentaram área específica de $104 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$ e as amostras de P(MMA-co-MAA) (R13, R14 e R15) apresentaram área específica de $79 \pm 2 \text{ m}^2/\text{g}$.

Tabela 5.4: Quantificação de lisina imobilizada nas nanopartículas.

Amostra	Reação	LYS imobilizada (mg _{LYS} /g _{NP})	LYS imobilizada (mg _{LYS} /m ² _{NP})	% LYS imobilizada
P(MMA-co-AA)	R07			
	R08	131 ± 13	1,7 ± 0,5	31 ± 2
	R09			
P(MMA-co-AA) CQ	R10			
	R11	139 ± 4	1,31 ± 0,02	33 ± 1
	R12			
P(MMA-co- MAA)	R13			
	R14	217 ± 53	2,8 ± 0,8	50 ± 12
	R15			

Os valores indicados são referentes a três amostras, sendo reportados como média ± desvio padrão. Nos ensaios de adsorção foi utilizada uma massa inicial de LYS de 40 mg.

Os resultados obtidos para a imobilização da lisina nas amostras de nanopartícula P(MMA-co-AA) contendo ou não clioquinol foram semelhantes, mostrando que a presença do fármaco não afeta o processo de adsorção. O resultado obtido para a amostra produzida com MAA foi maior, o que sugere que os tipos de grupos funcionais presentes na estrutura do polímero interferem na afinidade pela adsorção.

Verifica-se que ao menos metade da quantidade de lisina adicionada foi adsorvida à superfície das nanopartículas, sendo provável que a quantidade de aminoácido estipulada na metodologia experimental tenha sido superestimada. Neste caso, uma menor quantidade de aminoácido poderia ser empregada, garantindo ainda a ocorrência da reação.

Em relação ao potencial zeta das amostras de P(MMA-co-AA) após a imobilização da lisina, verifica-se um pequeno abaixamento do valor de -57 mV (amostra inicial) para -49 mV (amostra com lisina). A lisina é um aminoácido básico, com ponto isoelétrico em torno do pH igual a 9,7, de forma que, em água, meio empregado na análise, apresenta-se carregada positivamente. Desta forma, a redução das cargas negativas das partículas é justificada. Este resultado sugere a modificação da superfície das partículas pela inserção do aminoácido, no entanto, a carga parece fortemente controlada pela presença do surfactante, como anteriormente descrito.

No espectro de FTIR do aminoácido em questão, apresentado na Figura 5.3, verificam-se as bandas características dos grupos funcionais amino e ácido carboxílico, pertencentes à estrutura da lisina, em 1580 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} , respectivamente.

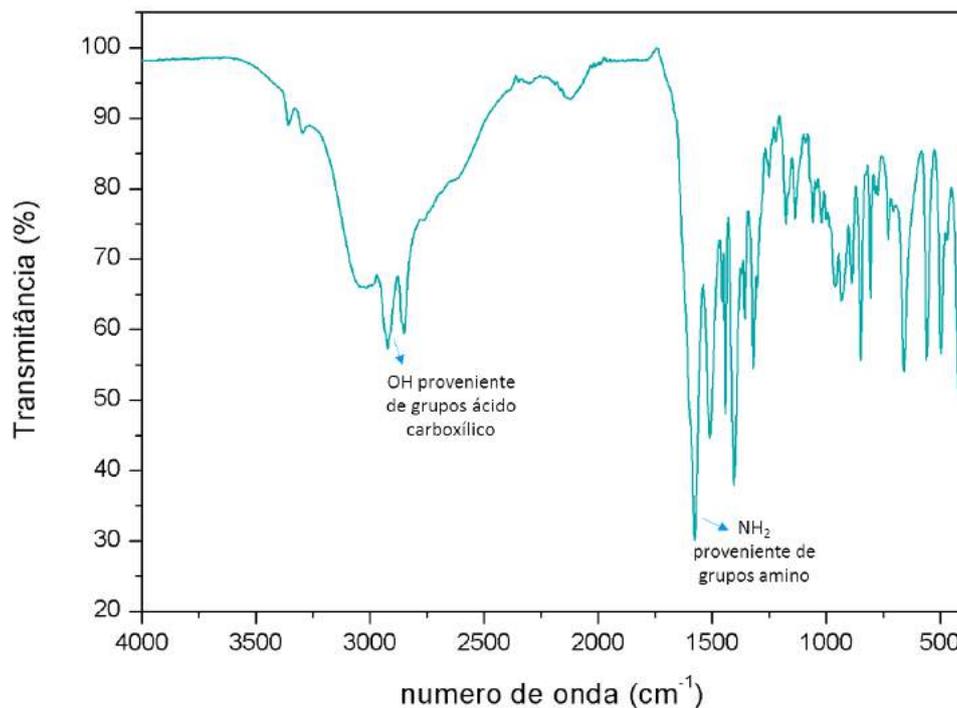


Figura 5.3: Espectro de FTIR do aminoácido lisina.

Os espectros de FTIR obtidos no ensaio de imobilização da lisina nas partículas de P(MMA-co-AA) são apresentados na Figura 5.4. Novamente, a avaliação foi realizada com base na comparação das amostras e diferenciação de picos característicos.

No espectro da amostra inicial, P(MMA-co-AA), foram novamente identificados os picos característicos dos grupamentos químicos presentes no material, como já discutido anteriormente. Para a amostra funcionalizada, foi possível notar o pico em 1642 cm^{-1} , bem definido, característico da ligação amida, o que sugere que a lisina foi covalentemente ligada às nanopartículas a partir da rota proposta.

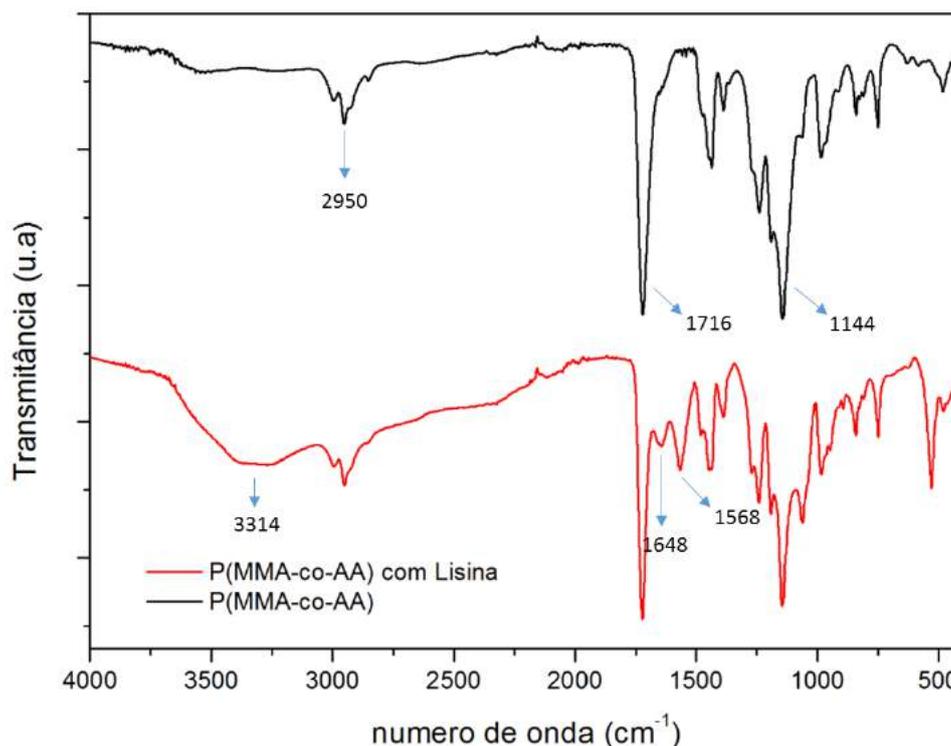


Figura 5.4: Espectro de FTIR das nanopartículas (R07) após o ensaio de imobilização com lisina.

Com o objetivo de confirmar a formação de ligação amida entre a lisina e a nanopartícula, realizou-se uma análise de RMN, cujos espectros são apresentados na Figura 5.5. O ensaio foi realizado nas mesmas condições anteriormente descritas, tendo como solvente o clorofórmio deuterado, sendo possível a comparação dos espectros para a amostra polimérica inicial e a amostra funcionalizada.

No espectro do aminoácido lisina, os picos referentes aos grupos químicos presentes na estrutura podem ser verificados. Os sinais em 1,3 e 1,5 ppm referem-se os hidrogênios dos carbonos alifáticos. Os picos em 2,1 e 2,3 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios do grupo amino da estrutura da lisina (PAVIA *et al.*, 2009).

A partir da comparação dos espectros de ^1H -RMN das amostras verifica-se que a principal diferença é o aparecimento de uma banda em torno de 5,0-6,0 ppm, típica do hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupamento amida. Este resultado complementa a análise de FTIR e comprova a ligação química formada e a presença de lisina na superfície da partícula.

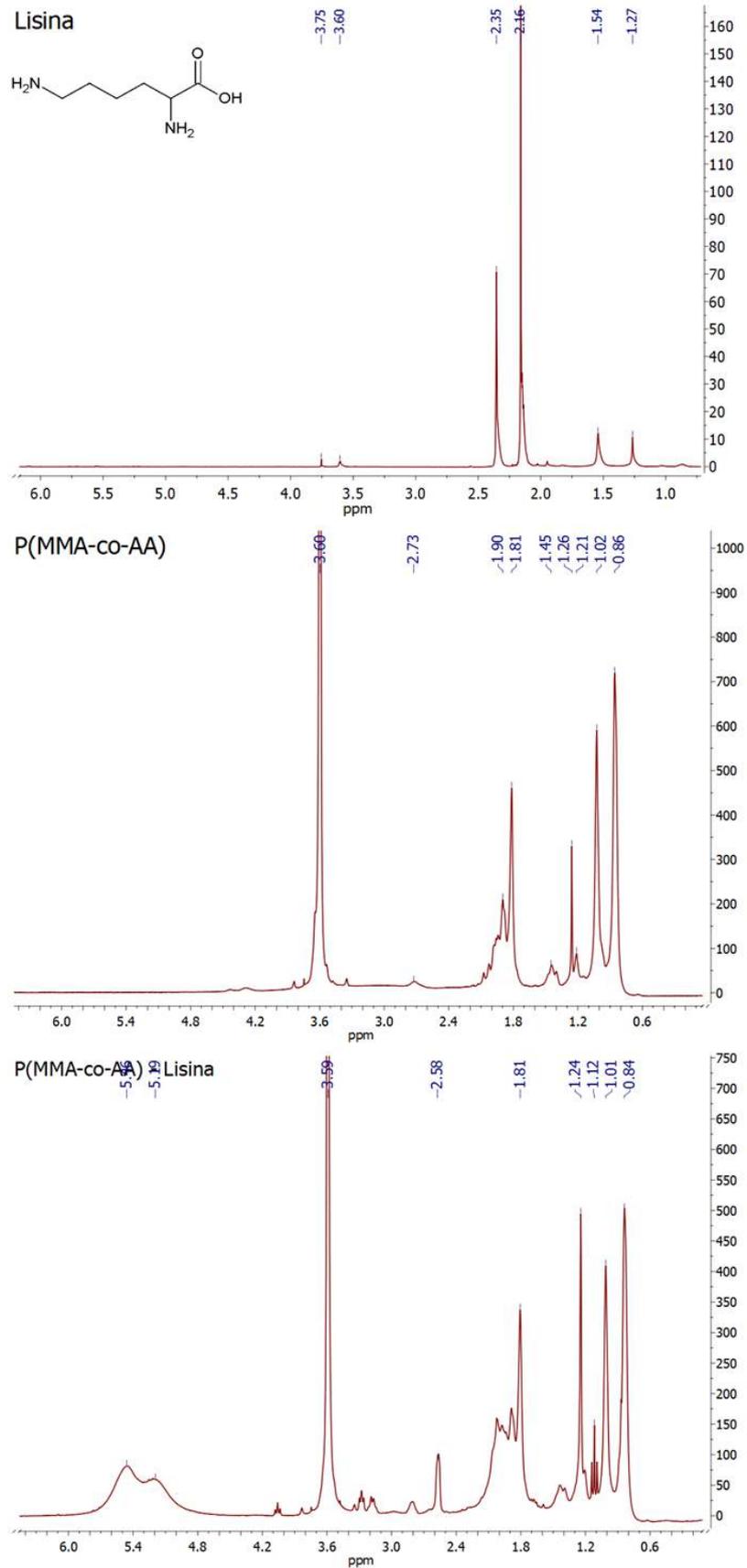


Figura 5.5: Espectro de H-RMN do aminoácido lisina e das nanopartículas (R07) antes e após a funcionalização.

Verifica-se que o referido pico na região de 5-6 ppm apresenta-se bastante largo. Este comportamento pode estar relacionado com o tempo de relaxação da molécula no solvente utilizado e a possíveis interações com a matriz, sugerindo a existência de domínios locais distintos, o que poderia ser investigado com maior profundidade.

Com o objetivo de comprovar adicionalmente a formação da ligação amida, um ensaio de dessorção foi conduzido. Amostras de nanopartículas funcionalizadas com lisina foram submetidas a sucessivas lavagens com diferentes soluções. O processo de lavagem e centrifugação foi realizado três vezes, sendo utilizadas soluções tampão de variados pH.

Após secagem em estufa de recirculação, realizaram-se análises em FTIR das amostras. Verificaram-se em todos os espectros os picos característicos da ligação amida, 3300 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , conforme demarcado na Figura 5.6. Este resultado evidencia que o aminoácido foi imobilizado nas nanopartículas em decorrência da formação de uma ligação química covalente e não somente pela sua adsorção física.

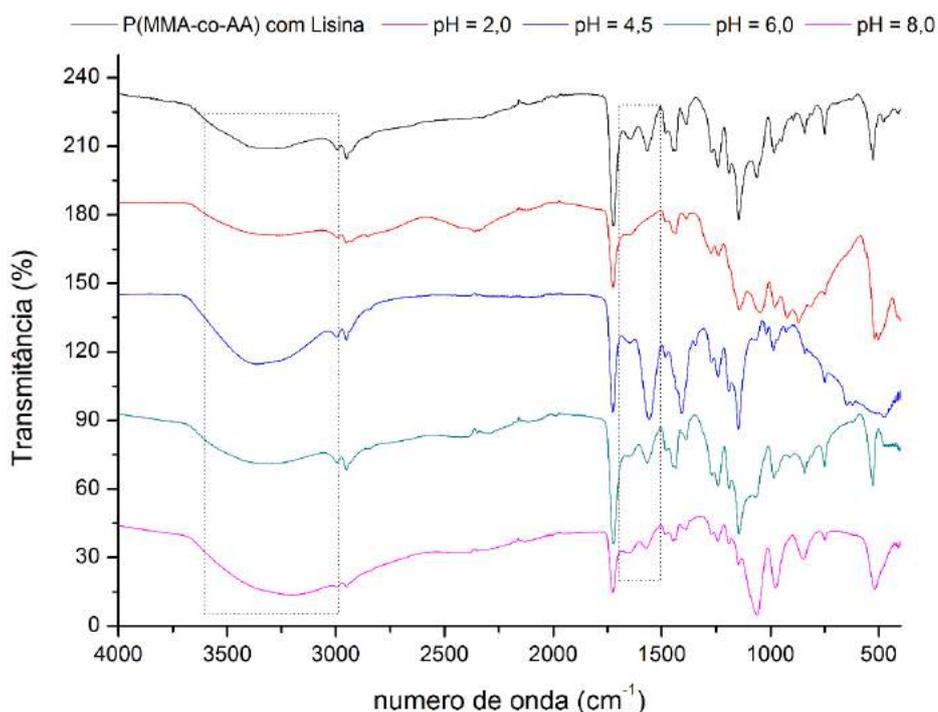


Figura 5.6: Espectro de FTIR das nanopartículas (R07) após lavagens com diferentes soluções.

A funcionalização com o aminoácido lisina foi também realizada para as partículas de P(MMA-co-MAA) e o espectro de FTIR, mostrado na Figura 5.7, também evidencia a formação da ligação química entre a lisina e o polímero, uma vez que os picos característicos em 1600 e 3300 cm^{-1} puderam ser observados.

Dessa forma, pode-se concluir que a rota de imobilização proposta foi capaz de funcionalizar as partículas poliméricas por meio da formação de uma ligação química. Com estes resultados, foi possível dar início aos ensaios de conjugação do peptídeo de interesse.

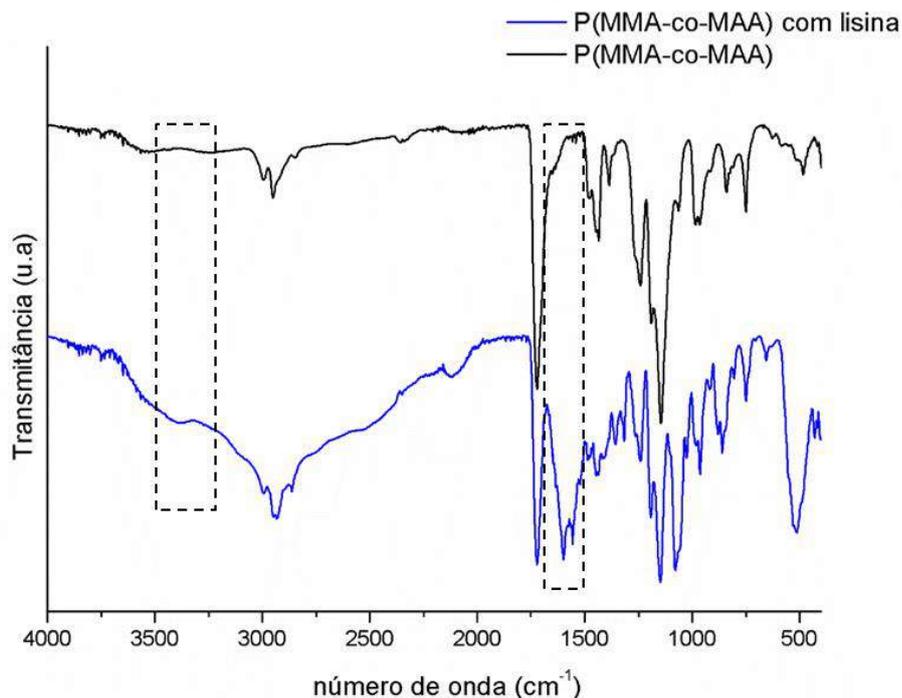


Figura 5.7: Espectro de FTIR das partículas de P(MMA-co-MAA) (R13) antes e após funcionalização.

5.1.3 Imobilização do peptídeo TAT

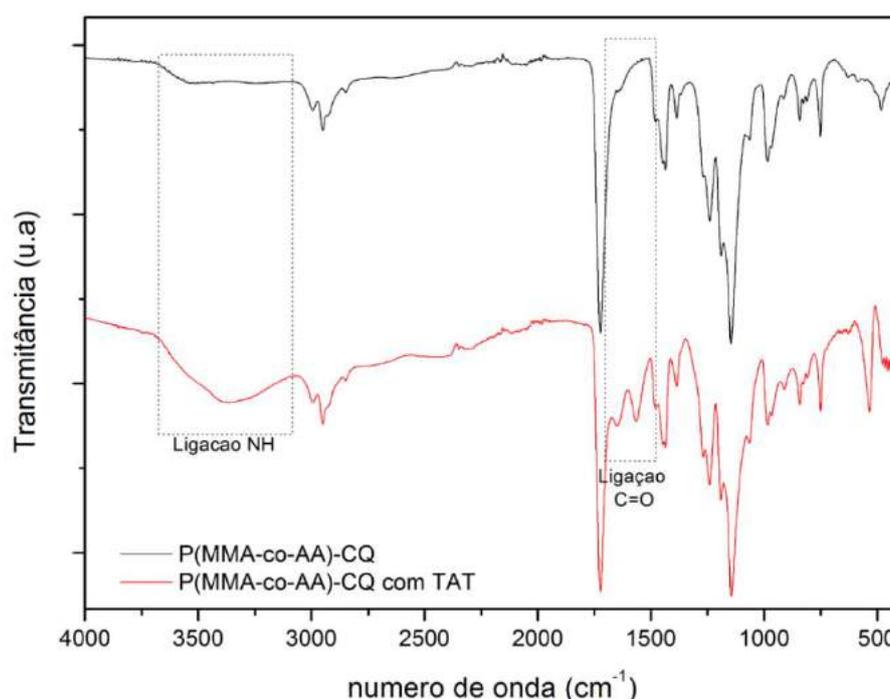
A metodologia empregada para imobilização do peptídeo TAT nas nanopartículas foi semelhante às descritas para BSA e lisina. Neste caso, o peptídeo foi adicionado na segunda etapa do processo de funcionalização na concentração de 1 mg/mL.

O peptídeo imobilizado foi quantificado pelo ensaio de BRADFORD, conforme apresentado na Tabela 5.5, e o resultado mostrou que cerca de 80% do TAT adicionado ao sistema foi imobilizado nas nanopartículas.

Tabela 5.5: Quantificação do peptídeo TAT imobilizado nas nanopartículas.

Amostra	Reação	TAT / NP (mg _{TAT} /g _{NP})	TAT / NP (mg _{TAT} /m ² _{NP})	% TAT imobilizado
P(MMA-co-AA) CQ	R10	40,8	0,39	81,5

O espectro de FTIR obtido após a imobilização do peptídeo TAT é apresentado na Figura 5.8. Conforme podia ser esperado, a amostra funcionalizada apresentou os picos característicos da formação da ligação amida, assim como quando o aminoácido lisina foi utilizado. O espectro de FTIR evidencia a ocorrência da formação da ligação covalente.


Figura 5.8: Espectro de FTIR das nanopartículas (R10) após o ensaio de imobilização do TAT.

5.1.4 Imobilização do marcador 2-Abz

A inserção de um marcador de fluorescência na superfície das partículas foi necessária para possibilitar a posterior análise nos ensaios *in vivo*. A molécula do 2-amino benzamida apresenta grupos amino em sua estrutura, como mostrado na Figura 3.4 anteriormente apresentada, que poderiam ser utilizados para funcionalização das partículas, partindo-se da rota de imobilização com EDC já utilizada nos demais testes. Assim como quando usadas as outras biomoléculas, a imobilização foi efetivada pela formação de uma ligação amida entre os grupos ácidos provenientes da nanopartícula e os grupos amino presentes nos ligantes.

Dessa forma, o mesmo procedimento de funcionalização já descrito foi utilizado para imobilização do marcador 2-Abz, sendo este adicionado na concentração de 5 mg/mL. A verificação da ligação amida formada foi realizada por análise de FTIR e o espectro obtido é apresentado na Figura 5.9. Novamente, conforme esperado, as bandas relativas a ligação amida estão presentes no espectro obtido.

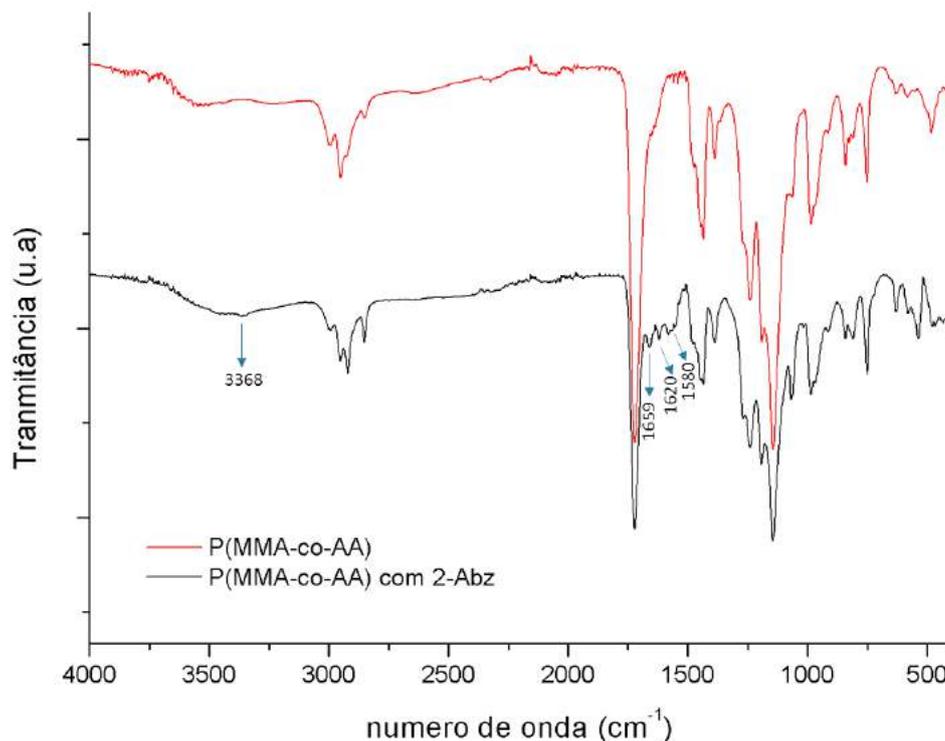


Figura 5.9: Espectro de FTIR para nanopartícula funcionalizada com o marcador de fluorescência 2-Abz.

É importante ressaltar que a rota química usada para imobilização neste trabalho é bastante versátil, sendo eficaz para funcionalização de suportes contendo grupos ácidos com diferentes tipos de moléculas. Os ligantes testados diferem quanto ao tamanho das moléculas, possibilidades de interações e presença de outros grupos químicos. Lisina e 2-Abz são moléculas pequenas, mas com estruturas que permitem diferentes tipos de interação com o suporte. A molécula do peptídeo TAT é maior, o que possibilita variadas formas de empacotamento e disposição dos grupos para ligação. Além disso, trata-se de um procedimento experimental simples, em que não são utilizados solventes tóxicos e não demanda muitas etapas. É importante atentar também para a influência do surfactante no processo de funcionalização.

5.2 CONCLUSÕES PARCIAIS

O presente capítulo apresentou os resultados obtidos durante os ensaios de funcionalização das nanopartículas. A presença do grupo funcional ácido carboxílico, adicionado pela copolimerização do MMA com monômeros ácidos, permitiu a conjugação, via reação química, de diferentes biomoléculas na superfície das partículas. A proteína BSA e o aminoácido lisina foram inicialmente estudados como moléculas modelo para desenvolvimento da metodologia de funcionalização. Com a técnica de funcionalização proposta, o peptídeo TAT, uma molécula de penetração celular, pôde ser conjugada na superfície das partículas. Para possibilitar a verificação das partículas nos ensaios *in vivo* e *in vitro* posteriores que seriam conduzidos, foi também imobilizado na superfície das nanopartículas o marcador de fluorescência 2-Abz. Apesar do baixo percentual de incorporação do comonômero ácido acrílico na cadeia polimérica, a formação da ligação amida foi evidenciada pelas análises de FTIR, RMN e pelo ensaio de dessorção. O material desenvolvido neste estágio do trabalho seguiu para os testes de liberação do fármaco.

Capítulo VI

RESULTADOS E DISCUSSÃO LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

6.1 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Os ensaios de liberação do fármaco clioquinol foram realizados com o intuito de determinar o perfil de liberação do fármaco e avaliar a cinética de liberação. Inicialmente realizou-se um estudo da solubilidade do fármaco no meio de liberação e foi feita a quantificação do clioquinol liberado em cada intervalo de tempo, tomada a partir de dados cromatográficos. O método analítico para determinação do clioquinol foi previamente validado, sendo avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.

6.1.1 Validação do método analítico de quantificação por HPLC

O método analítico usado para determinação do clioquinol foi desenvolvido tomando-se como base dados da literatura (CHHALOTIYA *et al.*, 2014). Os parâmetros cromatográficos foram avaliados para garantir a utilização do método para quantificação do clioquinol nos testes de liberação. Iniciou-se o desenvolvimento do método utilizando um tempo de corrida de 5 minutos; porém, este tempo foi alterado para 10 minutos, pois garantia melhor equilíbrio e condicionamento da coluna para análises sucessivas.

Na Figura 6.1 são apresentados os cromatogramas obtidos para a injeção do clioquinol em ACN, na concentração de 10 µg/mL e para o polímero também em ACN na mesma concentração, nas condições estabelecidas pelo método.

A comparação dos dois cromatogramas permite inferir a respeito da seletividade do método proposto. O polímero não apresenta picos que se sobreponham ao fármaco, não sendo um interferente na análise. Observa-se um pico de intensidade baixa em 2,25 minutos para o polímero. O clioquinol apresentou tempo de retenção em 2,7 minutos.

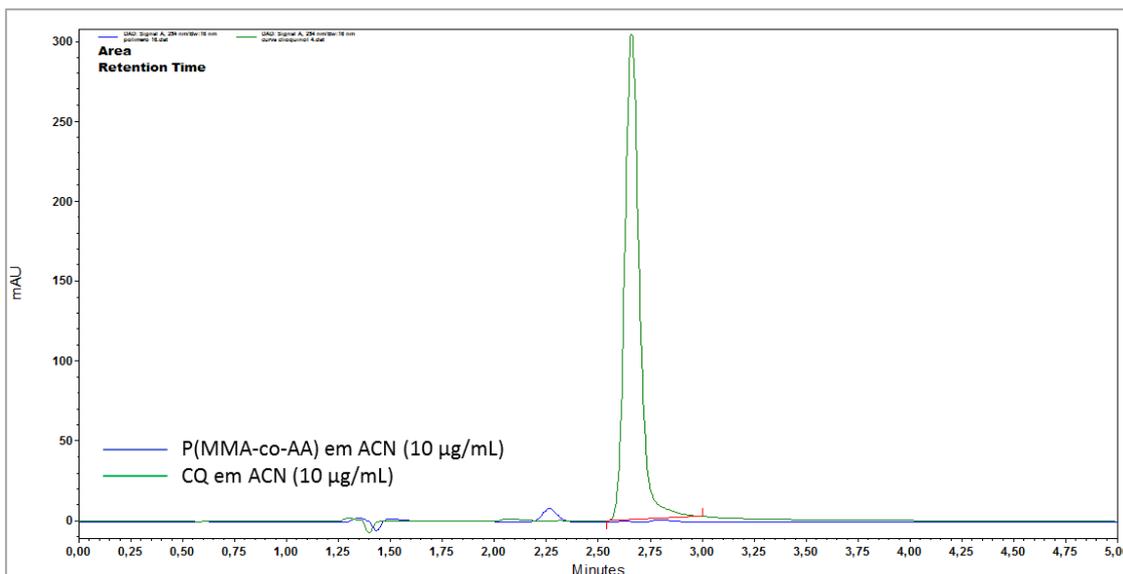


Figura 6.1: Cromatogramas de HPLC para CQ e P(MMA-co-AA) em ACN.

O método proposto apresentou-se linear para toda a faixa de concentrações (1 a 50 µg/mL) definida para a curva de calibração. Note que a curva de calibração foi montada a partir da média das áreas de três picos obtidos com base em pesagens diferentes. Na Figura 6.2 é apresentada a curva de calibração obtida, bem como o ajuste linear calculado. O ajuste linear obtido a partir dos dados cromatográficos resultou em coeficiente de correlação de $R^2 = 0,998$. A análise de variância mostrou que a regressão foi significativa e que os desvios da linearidade não eram significativos (p -valor < 0,05). A curva analítica obtida foi utilizada para o cálculo das concentrações do clioquinol nos testes de liberação.

A precisão do método foi expressa em termos do desvio padrão relativo (DPR) das medidas das amostras para cada um dos níveis de concentração avaliados (1, 20 e 50 µg/mL), não se admitindo valores superiores a 5%. Os resultados foram analisados em termo das concentrações e são apresentados na Tabela 6.1. Os valores de DPR obtidos encontraram-se abaixo de 5%, garantindo que o método proposto apresenta precisão adequada.

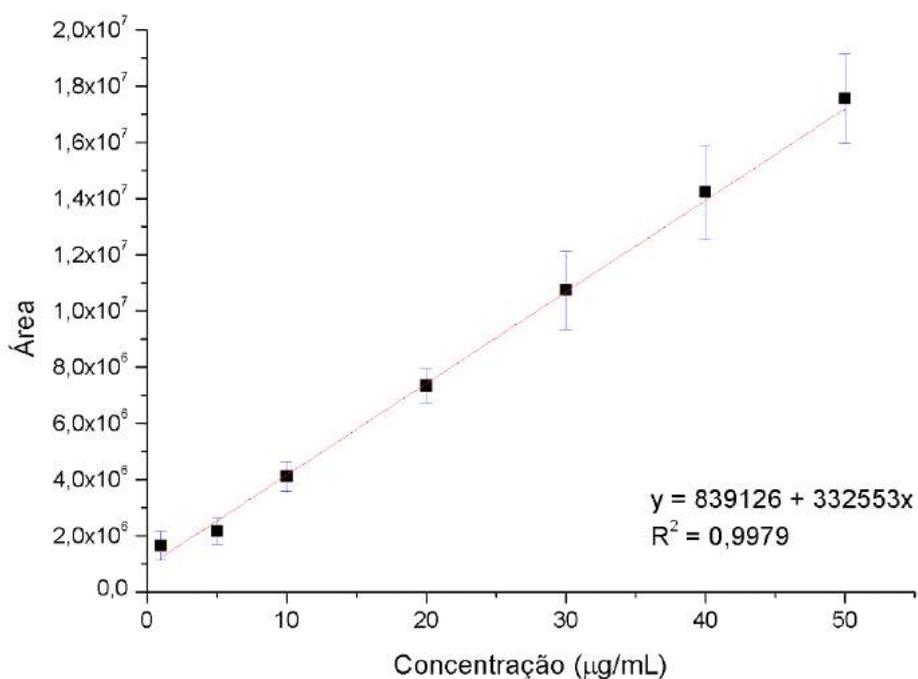


Figura 6.2: Curva analítica para verificação da linearidade do método cromatográfico.

Tabela 6.1: Desvios padrão relativos para avaliação da precisão nos ensaios de calibração de HPLC.

Intra-corrída (Dia 1)				Inter-corrída (Dia 2)			
Padrão (µg/mL)	Medida (µg/mL)	Média ± DP (µg/mL)	DPR (%)	Padrão (µg/mL)	Medida (µg/mL)	Média ± DP (µg/mL)	DPR (%)
1	1,84	1,90 ± 0,06	3,5	1	2,23	2,25 ± 0,03	1,2
	1,88				2,24		
	1,97				2,28		
20	20,6	21,2 ± 0,9	4,0	20	19,7	20,2 ± 0,5	2,6
	22,1				20,7		
	20,7				20,1		
50	54,0	52 ± 1	2,8	50	53,7	51 ± 2	4,2
	51,9				49,4		
	51,1				51,0		

A exatidão do método foi avaliada a partir da recuperação do clioquinol, quando este era contaminado com outros constituintes do sistema. Neste caso, as soluções de clioquinol em ACN foram contaminadas com o polímero. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Porcentagem de recuperação do clioquinol para avaliação da exatidão dos ensaios de HPLC.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração medida (µg/mL)	Recuperação (%)	Média ± DP (µg/mL)
0,9	0,84	93	92 ± 2
	0,82	91	
	0,81	90	
18	18,6	103	103 ± 3
	18,9	105	
	18,0	100	
45	41,4	92	98 ± 5
	45,5	101	
	45,0	100	

De acordo com os valores apresentados na Tabela 4.15, o método apresentou exatidão adequada, uma vez que a porcentagem de recuperação de fármaco estava de acordo com a requerida, entre 80 e 120%.

O limite de detecção foi calculado de acordo com a Equação 3.1, obtendo-se um valor de 1,74 µg/mL. Este resultado representa o menor valor com que o pico de eluição do fármaco poderia ser apropriadamente detectado.

Para o cálculo do limite de quantificação, utilizou-se a Equação 3.2, obtendo-se o valor de 5,81 µg/mL, sendo esta a menor concentração para o qual se conhecem a exatidão e a precisão do método.

Apresentam-se, na Tabela 6.3, os dados da validação da metodologia analítica de modo resumido. Os testes comprovaram a validade do método, possibilitando a sua utilização nos estudos de liberação do fármaco.

Tabela 6.3: Parâmetros de validação do método de HPLC proposto para quantificação do clioquinol.

Parâmetro	Resultado
Seletividade	Positivo
Linearidade	$R^2 = 0,998$
Precisão	DPR < 5%
Exatidão	92% a 103%
Limite de detecção	1,74 µg/mL
Limite de quantificação	5,81 µg/mL

6.1.2 Avaliação da liberação do fármaco

O teste de solubilidade do clioquinol em tampão de PBS, pH = 7,4, contendo diferentes concentrações de SDS permitiu selecionar uma condição em que o fármaco apresentasse mais afinidade com o meio de liberação, sendo mais facilmente solubilizado. Foi avaliada adição de concentrações de 1 a 5% (m/v) de SDS ao tampão PBS. As medidas das concentrações de saturação determinadas após incubação das amostras por 24 horas a 37 °C e sob agitação, são apresentadas na Figura 6.3

A leitura da amostra contendo 2% de SDS foge do padrão crescente encontrado para os demais casos. É provável que esta medida não esteja correta, tendo sido por isso desconsiderada para avaliação do meio de liberação. Com base nos resultados obtidos no teste de solubilidade, escolheu-se a solução tampão de PBS contendo 4% (m/v) de SDS para utilização como meio de liberação nos ensaios seguintes. Esta condição foi selecionada porque permitiu a solubilização de uma concentração mais alta de clioquinol. A utilização de 5% de SDS não levou a ganho apreciável de solubilidade.

Ressalta-se que a concentração de SDS utilizada nos testes de liberação foi muito elevada, de maneira que esta condição não condiz com as condições típicas que seriam encontradas no organismo. No entanto, o teste de liberação, neste caso, foi utilizado somente como um modelo para descrever o padrão cinético de transferência do fármaco para um meio aquoso. É importante ainda desenvolver técnicas para avaliação do perfil de liberação de fármacos hidrofóbicos a partir das nanopartículas que não utilizem grandes quantidades de surfactantes e ainda que estes sejam substituídos por compostos de origem natural.

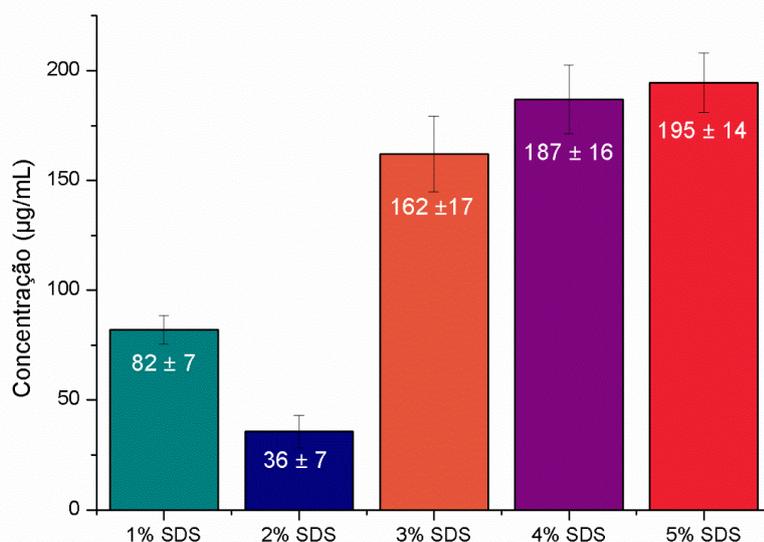


Figura 6.3: Concentração de saturação do ciprofloxacino em solução de PBS (pH = 7,4) contendo diferentes concentrações de SDS.

De acordo com a concentração de saturação do fármaco e levando-se em conta a manutenção da condição *sink* (ou seja, que o volume do meio de dissolução garanta um mínimo de três vezes aquele necessário para obter uma solução saturada do fármaco) (RAWAT e BURGESS, 2011), calculou-se a concentração máxima de ciprofloxacino que deveria ser utilizada nos testes de liberação. Dessa forma, a máxima concentração de ciprofloxacino foi determinada como sendo igual a 65 µg/mL.

Com base na eficiência de encapsulamento das nanopartículas, determinou-se o volume de látex adicionado em cada recipiente. Nos testes de liberação foram utilizados 1 mL do látex contendo as nanopartículas com ciprofloxacino (2 mg/mL, com eficiência de encapsulamento de 97% para partículas do copolímero com AA e 98% para partículas do copolímero com MAA) em 29 mL de meio de liberação. Foram retiradas alíquotas de 1 mL em intervalos de tempo determinados e igual volume de meio de liberação foi repostado ao sistema, mantendo-se o volume total constante e igual a 30 mL.

Os ensaios de liberação (N = 3) foram realizados para as nanopartículas de P(MMA-co-AA) contendo 1% (m/m) de ciprofloxacino, sintetizadas na reação de polimerização R12, por 9 horas. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 6.4, são reportados como a porcentagem de liberação, baseada na máxima concentração de ciprofloxacino no meio, em função do tempo. As barras mostram os desvios padrões de cada medida.

Os dados de liberação foram ajustados aos modelos matemáticos comumente utilizados para este tipo de sistema: modelo de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Peppas. O ajuste dos dados foi realizado no programa OriginPro 8 (OriginLab, Massachusetts, EUA), usando o procedimento de mínimos quadrados, com nível de confiança de 95%. A seleção do modelo mais adequado para interpretação dos dados se deu pelo coeficiente de correlação (R^2) obtido. Dessa forma, o modelo de Peppas foi o mais apropriado, sendo o ajuste mostrado também na Figura 6.4.

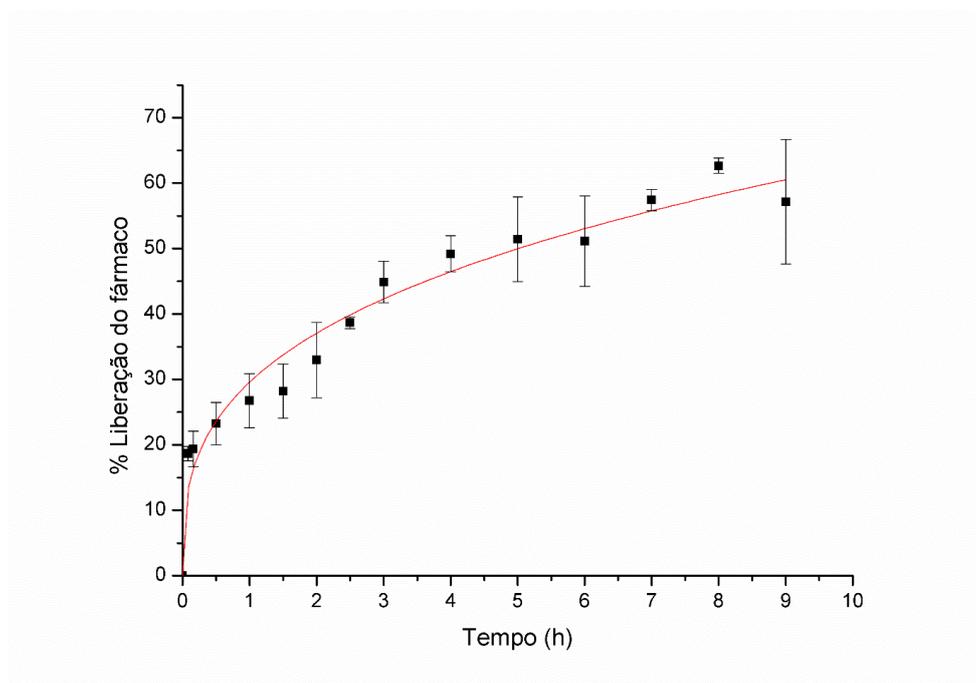


Figura 6.4: Perfil de liberação do fármaco clioquinol a partir das nanopartículas de P(MMA-co-AA) e modelo de Peppas ajustado.

O perfil obtido mostrou uma taxa de liberação lenta, de modo geral. No início do teste, observa-se uma liberação rápida, sendo cerca de 20% do fármaco liberado nos primeiros 30 minutos. A liberação inicial pode ser atribuída à presença de fármaco na superfície das nanopartículas, sendo este rapidamente removido para o meio. Este *burst* inicial pode indicar que grande parte do fármaco encontra-se numa região mais periférica da partícula. Nas 3 horas seguintes, o perfil de liberação aumentou para 50% e aparentemente se estabilizou, caracterizando a resistência difusiva. Dessa forma, acredita-se que o principal mecanismo responsável pela liberação do clioquinol seja por difusão.

Em relação à cinética de liberação, os resultados sugerem que o modelo Peppas apresentou o ajuste mais adequado aos dados obtidos, indicando que a liberação é controlada principalmente pela difusão e resistência à transferência de massa para o

meio. Na Tabela 6.4 são mostrados os coeficientes de correlação para os modelos avaliados, bem como os parâmetros do modelo de Peppas ajustado.

Tabela 6.4: Modelos cinéticos de liberação e coeficiente de correlação.

Ordem Zero	Primeira ordem	Higuchi	Peppas		
$Q = k_0 \cdot t + Q_0$	$Q = Q_0 \cdot e^{k_1 \cdot t}$	$Q = k_H \cdot \sqrt{t}$			
	R^2		R^2	n	k_p
0,828	0,726	0,884	0,964	0,32 ± 0,05	30 ± 3

Q representa a fração do fármaco liberada no tempo t e Q_0 representa a quantidade inicial de fármaco.

Em relação ao teste de liberação para a amostra de P(MMA-co-MAA), R16, os resultados, apresentados na Figura 6.5, mostram um perfil de liberação muito diferente. De acordo com a Figura 6.5 é possível dizer que na amostra com MAA o clioquinol não foi liberado, sendo observado somente cerca de 1% do clioquinol contido das partículas. O ácido metacrílico apresenta em sua estrutura química um grupo metila a mais, se comparado a estrutura do ácido acrílico, que confere um caráter mais apolar ao MAA. Esta característica faz com que o clioquinol permaneça mais retido nas partículas de P(MMA-co-MAA), não sendo observada a liberação.

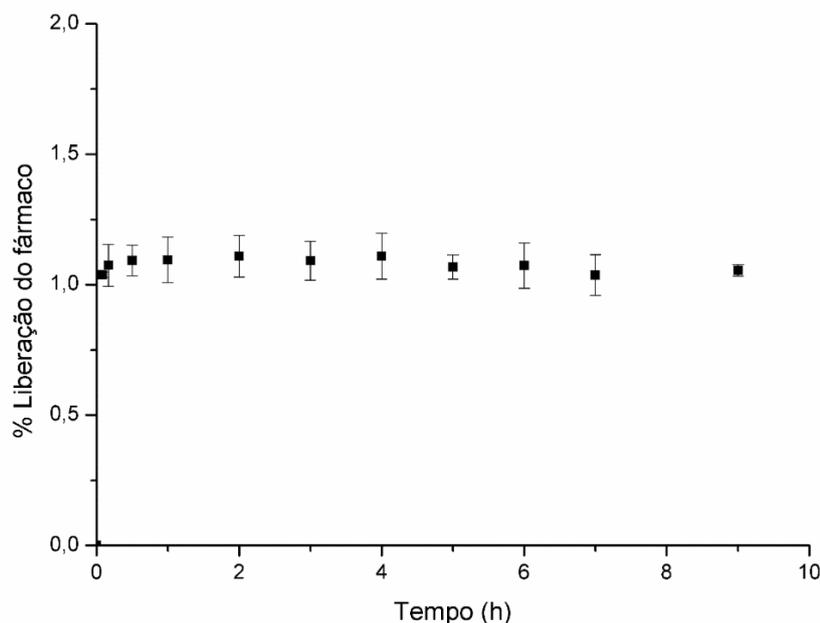


Figura 6.5: Perfil de liberação do fármaco clioquinol a partir das nanopartículas de P(MMA-co-MAA).

As duas amostras estudadas apresentaram comportamento de liberação do fármaco bastante diferentes. O copolímero produzido com AA alcançou cerca de 50% de liberação em um perfil crescente; já no sistema produzido com MAA, não ocorreu liberação. Este resultado mostra que a estrutura da matriz polimérica exerce grande influência no padrão de liberação de fármacos. Dessa maneira, o estudo de novas condições de polimerização, utilizando monômeros com caráter hidrofílico que favoreçam a disponibilização do fármaco podem garantir a modulação do perfil de liberação.

6.2 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados relacionados aos testes de liberação do fármaco clioquinol foram descritos e discutidos no presente capítulo. A detecção do fármaco liberado foi possível mediante a utilização da técnica de HPLC, sendo necessário desenvolver e validar um método cromatográfico para quantificação. Os perfis de liberação obtidos para as amostras dos polímeros com AA e com MAA foram muito diferentes. As partículas com AA liberaram cerca de 50% do clioquinol em um perfil de liberação gradual e nas partículas com MAA, o clioquinol não foi liberado. Dessa forma, a cinética de liberação de um fármaco a partir de nanopartículas é influenciada sobretudo pela composição da matriz polimérica. Acredita-se que o mecanismo de liberação do clioquinol a partir das nanopartículas se dê principalmente por difusão por entre os poros da matriz polimérica. Após esta etapa, foram iniciados os testes para verificação da capacidade das partículas para atravessar a BHE e alcançar as células do cérebro para disponibilização específica do fármaco.

Capítulo VII

RESULTADOS E DISCUSSÃO PERMEAÇÃO NA BHE

7.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PERMEAÇÃO NA BHE *in vivo*

O reconhecimento do peptídeo TAT pelas células da barreira hematoencefálica e a capacidade de passagem das nanopartículas funcionalizadas por esta membrana foi avaliado por meio de ensaios *in vivo* utilizando camundongos como modelo. A verificação da presença das nanopartículas nos cérebros dos animais após as administrações foi realizada por detecção do marcador de fluorescência 2-Abz imobilizado.

Os ensaios iniciais foram realizados utilizando as nanopartículas do copolímero com AA. Para as nanopartículas produzidas com MAA, foi realizado apenas o último ensaio de rastreamento nos órgãos.

7.1.1 Detecção por espectrofotômetro de fluorescência

A primeira técnica utilizada para verificação da presença das nanopartículas no cérebro foi a detecção por espectrofotômetro de fluorescência, sendo inicialmente realizado um teste preliminar para avaliação e definição da técnica pretendida. Neste experimento, a preparação (NP-TAT-2Abz) contendo as nanopartículas (copolímero com AA) foi adicionada diretamente ao cérebro macerado e homogeneizado em diferentes diluições. Todas as diluições foram feitas em tampão de PBS (pH = 7,4). A Figura 7.1 apresenta o perfil de fluorescência obtido neste primeiro teste. O principal objetivo deste teste foi verificar a intensidade de fluorescência do marcador, quando misturado aos demais constituintes do cérebro, uma vez que a amostra não passou por qualquer processo de purificação e remoção de proteínas, que poderiam atuar como interferentes.

Como mostrado na Figura 7.1, o marcador 2-Abz apresentou uma boa intensidade de fluorescência, com comprimento de onda máximo de emissão em 420 nm, como esperado. O cérebro macerado e diluído em tampão de PBS foi utilizado como controle e não apresentou fluorescência no comprimento de onda estudado. Este comportamento mostra que os constituintes do tecido não interferem na medida que a amostra pode ser utilizada sem purificação. As amostras contendo o cérebro e a preparação adicionada apresentaram intensidade de fluorescência em 420 nm, atribuída ao marcador 2-Abz, e perfil de comportamento semelhante ao do marcador puro. Ressalta-se que é possível verificar a presença do marcador mesmo em baixa concentração, com diluição de até 4000 vezes.

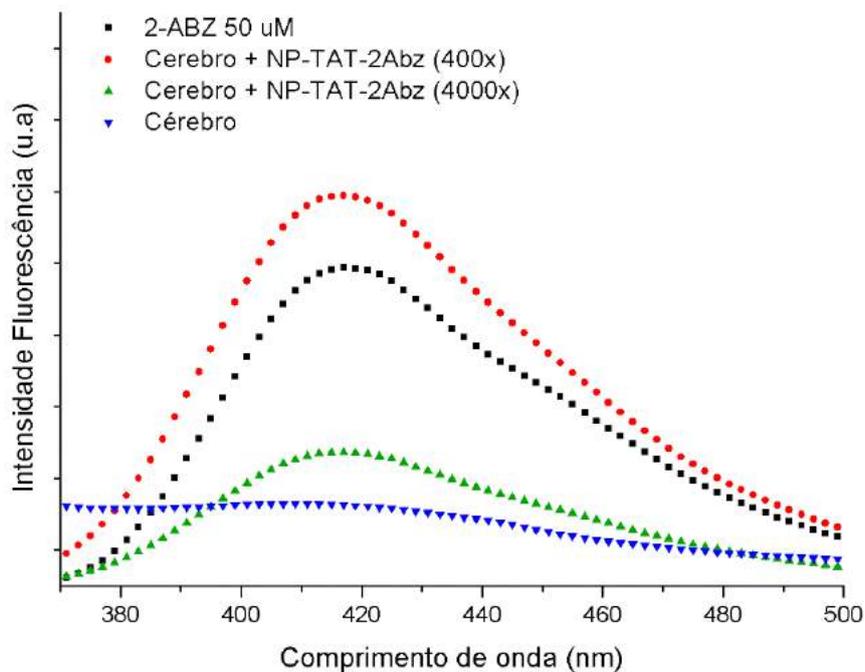


Figura 7.1: Perfis de fluorescência para definição da técnica – Nanopartículas funcionalizadas adicionada diretamente ao cérebro.

Ainda com o objetivo de avaliar o desempenho da técnica de detecção, realizou-se uma injeção intracraniana das partículas no animal. Neste caso, foram injetados 3 μ L da preparação, sendo a concentração de 2-Abz igual a 0,75 mg/mL. Esperou-se um intervalo de 2 horas e procedeu-se a preparação da amostra para análise no espectrofotômetro. A Figura 7.2 apresenta o perfil obtido. Novamente, o cérebro do animal não tratado não apresentou máximo de fluorescência no comprimento de onda de 420 nm. O cérebro após a injeção IC mostra o perfil característico do marcador 2-

Abz, sendo possível a sua clara detecção. Dessa forma, a análise das amostras, sem qualquer procedimento de purificação, por espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada para verificação da presença das nanopartículas no cérebro.

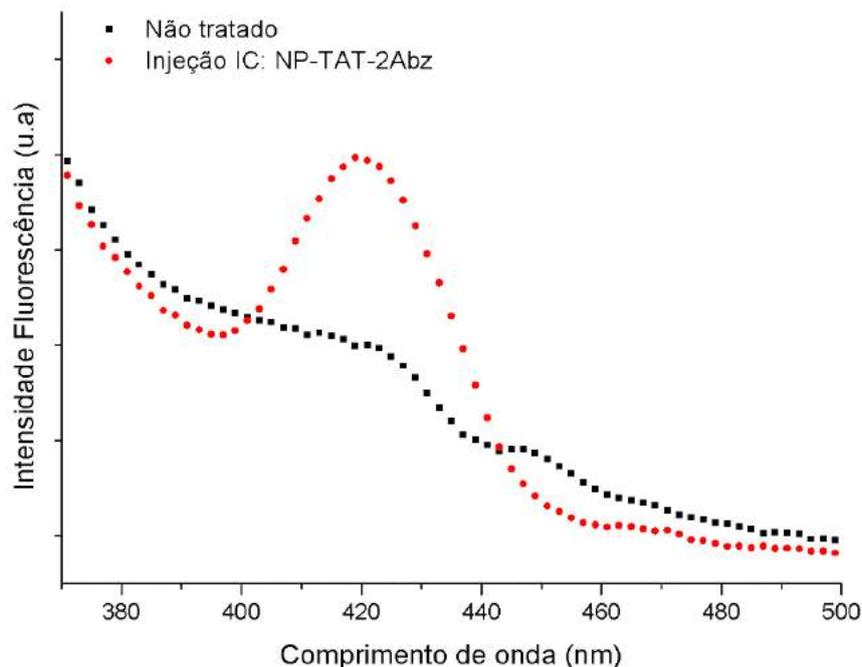


Figura 7.2: Perfis de fluorescência para injeção IC das nanopartículas funcionalizadas no intervalo de circulação de 2 horas.

Com estes resultados, a administração periférica da preparação nos animais foi iniciada. A administração pela via intraperitoneal foi a escolhida em princípio, devido à maior simplicidade do procedimento e facilidade de injeção. Após injeção, os animais foram mantidos em ambiente confortável, com água e alimentação à vontade por uma hora, para circulação das nanopartículas no organismo. Logo depois deste intervalo, os cérebros foram dissecados e as amostras devidamente preparadas para as medidas no espectrofotômetro. As curvas obtidas neste experimento são mostradas na Figura 7.3. Como controle neste experimento, foi utilizado o cérebro de um animal não tratado e a injeção de nanopartículas funcionalizadas apenas com o marcador 2-Abz; ou seja, não contendo o peptídeo TAT imobilizado.

Como pode ser observado, o perfil de fluorescência para cada uma das amostras é diferente. As amostras controle (NP-2Abz e Não tratado) não apresentam máximo em 420 nm. O perfil obtido para a injeção da preparação (NP-TAT-2Abz) foi semelhante ao perfil mostrado na Figura 7.1, relativo ao marcador. Porém, a intensidade observada foi

baixa, se comparada à curva dos controles e ao perfil anterior (preparação adicionada diretamente ao cérebro), o que torna o resultado inconclusivo a respeito da capacidade das partículas chegarem ao cérebro.

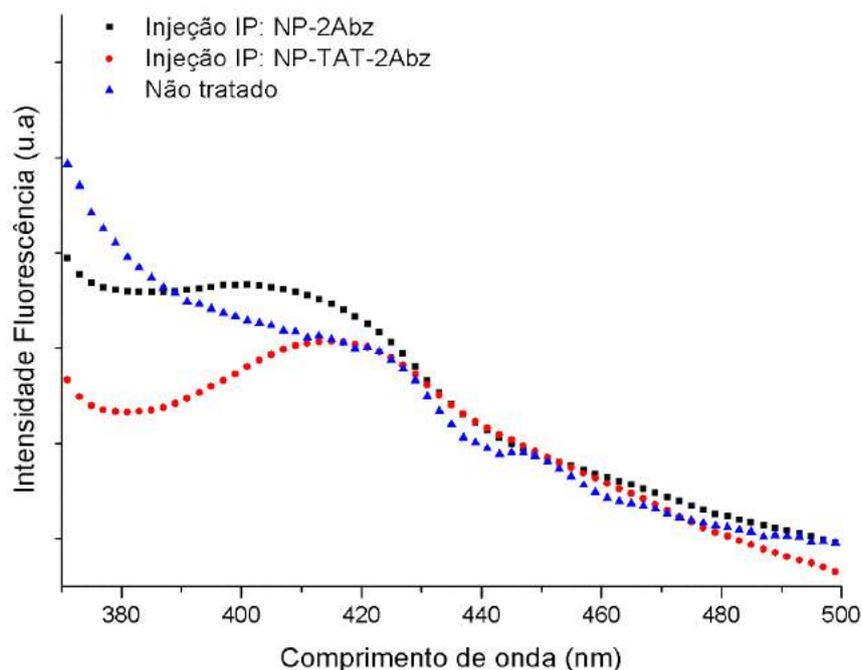


Figura 7.3: Perfis de fluorescência após injeção IP das nanopartículas funcionalizadas com o peptídeo TAT e sem funcionalização no intervalo de circulação de 1 hora.

Os dados obtidos neste experimento foram considerados promissores e encorajaram a continuação dos testes, aumentando-se o tempo de circulação no organismo e a concentração de marcador e TAT nas partículas injetadas. Assim, diferentes formulações foram preparadas e injetadas via IP, com concentração de TAT variando de 0,75 a 3,75 mg/mL e concentração de 2-Abz de 0,75 a 2,25 mg/mL. Para a via de administração IP o volume de preparação injetada foi mantida em 10 μ L/g do animal. Os animais utilizados apresentavam massa corpórea média de 30 g, sendo então injetado 300 μ L da preparação contendo as nanopartículas. No experimento foram avaliados os tempos de circulação de 2, 4 e 6 horas. Os perfis obtidos nesses testes, apresentados na Figura 7.4, não sugerem a presença das nanopartículas no cérebro dos animais, sendo também inconclusivo. É importante ressaltar que o tempo de circulação da preparação no organismo do animal, não apresentou efeito sobre os perfis de fluorescência.

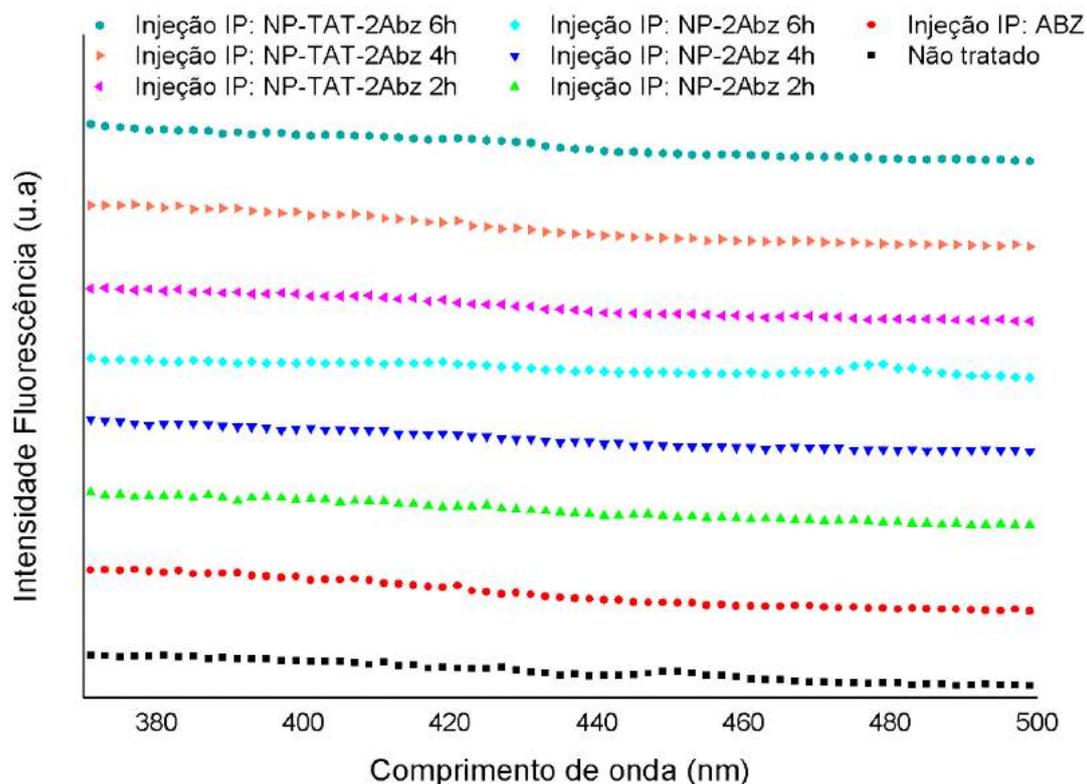


Figura 7.4: Perfis de fluorescência das partículas no cérebro dos animais após injeção IP de amostras funcionalizadas com o peptídeo TAT e sem funcionalização para tempos de circulação de 2, 4 e 6 h.

Os resultados deste experimento com diferentes tempos de circulação no organismo levaram à formulação da hipótese de que as partículas poderiam se distribuir uniformemente pelo corpo do animal, fazendo com que a concentração de partículas que efetivamente chegam ao cérebro fosse pequena e não detectável pela técnica utilizada.

Para avaliar essa hipótese, estimou-se a razão de massa de TAT e 2-Abz em relação à massa total do animal, considerando a distribuição das partículas em todo o corpo. O valor obtido foi comparado com a massa de TAT e 2-Abz injetada diretamente no cérebro via injeção IC, para determinar a mínima concentração possível de ser detectada, visto que o perfil de fluorescência obtido neste caso foi claro quanto à presença do marcador.

Os resultados deste cálculo são apresentados na Tabela 7.1. A massa de ligante foi calculada tomando-se a concentração de 2-Abz e TAT na preparação e considerando um volume médio de injeção de 300 μ L para via IP e 3 μ L para via IC. A massa média do animal considerada foi de 30 g. No caso da via IC, considerou-se a distribuição no cérebro, sendo a massa média utilizada de 0,5 g (DAVIES e MORRIS, 1993).

Tabela 7.1: Cálculo da razão m/m de distribuição de 2-Abz e TAT.

Via de administração	2-Abz injetado ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	TAT injetado ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Razão m/m	
			2-Abz/animal	TAT/animal
IP	0,75	0,75	$7,5 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-6}$
	1,125	1,875	$1,13 \times 10^{-5}$	$1,88 \times 10^{-5}$
	2,25	3,75	$2,25 \times 10^{-5}$	$3,75 \times 10^{-5}$
IC	2,25	3,75	$1,35 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$

O perfil de fluorescência obtido quando a injeção IC foi realizada mostrou-se claro e a quantidade injetada foi detectável, conforme anteriormente apresentado. Neste caso, admitindo-se que as partículas se distribuam pelo cérebro do animal, o marcador deve ser encontrado na razão (m/m) de $1,35 \times 10^{-5}$. Este valor pode ser considerado a menor concentração de 2-Abz capaz de ser detectada. Com o objetivo de verificar a concentração de marcador utilizada nos testes com injeção IP, admitiu-se a hipótese de que as partículas se distribuem uniformemente pelo corpo do animal. Caso esta hipótese fosse verdadeira e a razão (m/m) de 2-Abz fosse maior que o obtido para a injeção IC, as partículas deveriam ser detectadas pela técnica de fluorescência utilizada, se estas conseguirem atravessar a BHE e chegar ao cérebro. Os valores calculados foram maiores somente quando a preparação contendo $2,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de 2-Abz e $3,75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TAT foi utilizada, mostrando que, se as partículas estivessem no cérebro, seriam detectadas. Porém, o perfil de fluorescência obtido no experimento utilizando esta preparação foi ainda inconclusivo.

Na hipótese de que ocorresse a distribuição das partículas por todo o organismo do animal, realizou-se um experimento para verificar o possível acúmulo das nanopartículas em outros órgãos. A preparação foi injetada via IP e EV, com intervalo de circulação de 2 horas. Neste teste foram avaliados, além do cérebro, o fígado, o coração, o baço e os rins, sendo as amostras preparadas de modo similar aos testes anteriores. Os perfis obtidos, mostrados na Figura 7.5, não apresentaram intensidade de fluorescência no intervalo avaliado; ou seja, as partículas, com e sem a presença do peptídeo TAT, não foram detectadas. Dentre os perfis mostrados, a injeção da preparação de NP-2Abz pela via IP chamou a atenção, por apresentar um sinal em 420 nm, o que poderia ser referente a presença de partículas no coração do animal.

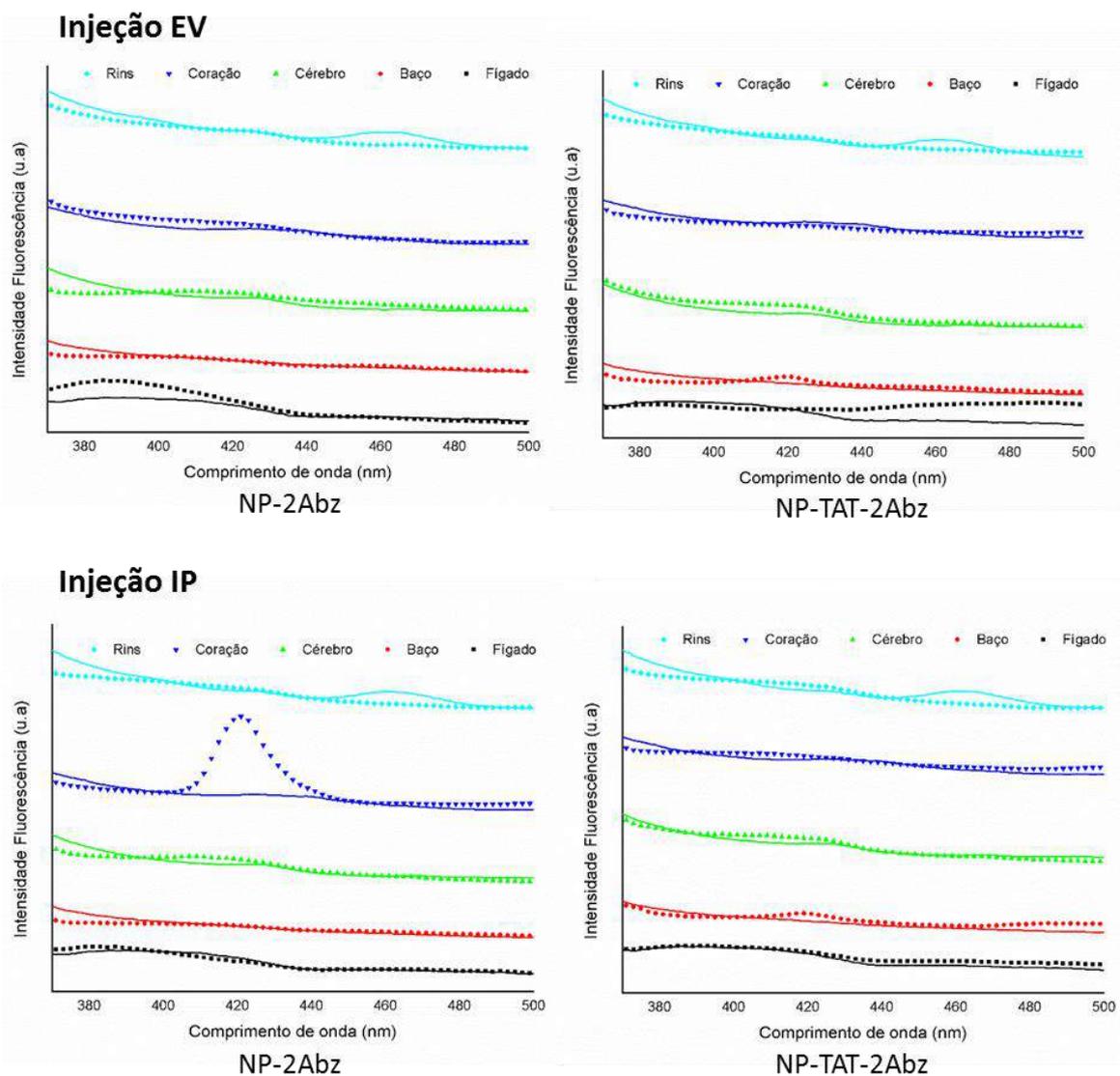


Figura 7.5: Perfis de fluorescência nos órgãos estudados após injeção IP e EV da preparação NP-2Abz e NP-TAT-2Abz.

Um experimento para avaliação da cinética de circulação das partículas no organismo do animal foi realizado por meio de coletas de sangue após injeção EV da preparação. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo estabelecidos, totalizando 2 horas de acompanhamento. Para avaliação dos perfis de fluorescência, as amostras de sangue foram diluídas em tampão de PBS (pH = 7,4) na razão de 1/1250. Os resultados obtidos estão sintetizados na Figura 7.6. A linha representa a amostra recolhida do animal não tratado (controle negativo) e o pontilhado representa as amostras coletadas após injeção da preparação NP-TAT-2Abz.

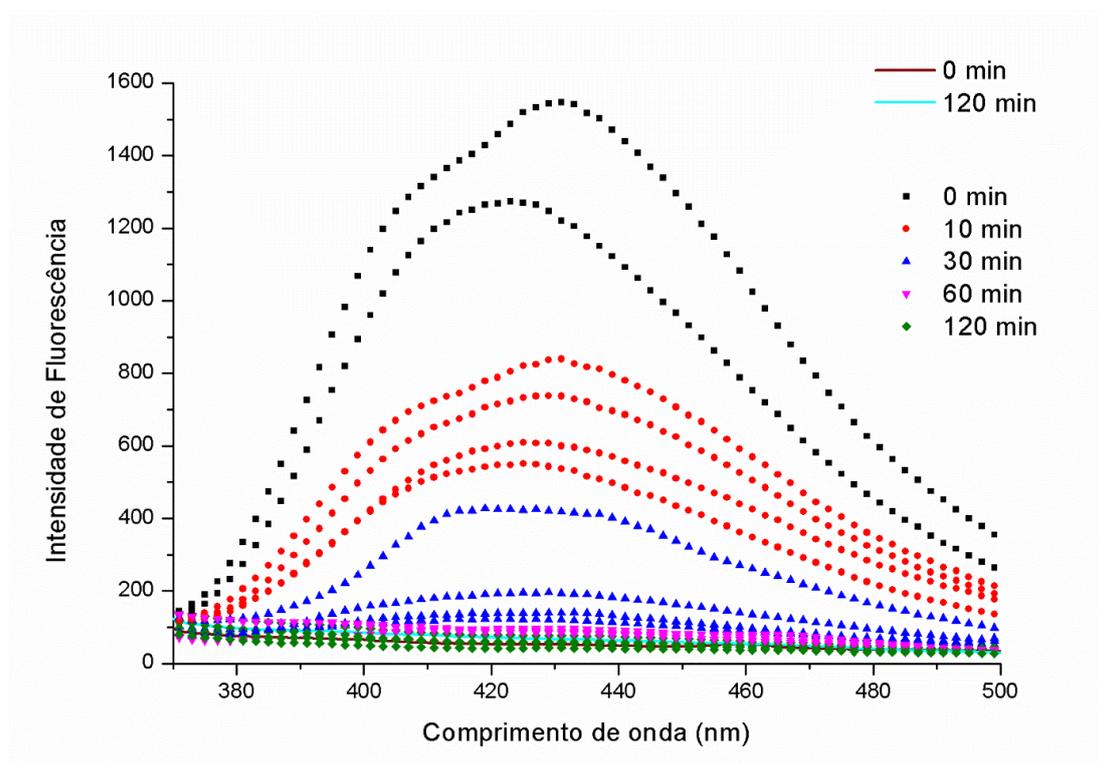


Figura 7.6: Dinâmica das nanopartículas no sangue do animal a partir das análises de fluorescência das amostras coletadas em tempos de circulação determinados.

De acordo com a Figura 7.6 a concentração de partículas no sangue diminui com o passar do tempo, de maneira que ao final de 2 horas as partículas não são mais encontradas. Os perfis mostram que as partículas ficam na circulação sanguínea até no máximo 60 min. É importante lembrar que em todos os experimentos realizados até então foi considerado um tempo de circulação maior que 60 min e que nestes testes os resultados foram considerados inconclusivos.

Com o objetivo de quantificar o material presente no sangue em cada tempo, os perfis de fluorescência foram normalizados no intervalo de 400 a 460 nm e as linhas de base corrigidas. A quantidade de nanopartículas foi estimada pelo cálculo da área abaixo de cada gráfico. Os valores obtidos foram ainda normalizados em relação à maior área, permitindo uma comparação relativa entre eles. Na Figura 7.7 são mostrados os perfis corrigidos e a comparação da quantidade de nanopartícula presente no sangue em cada tempo.

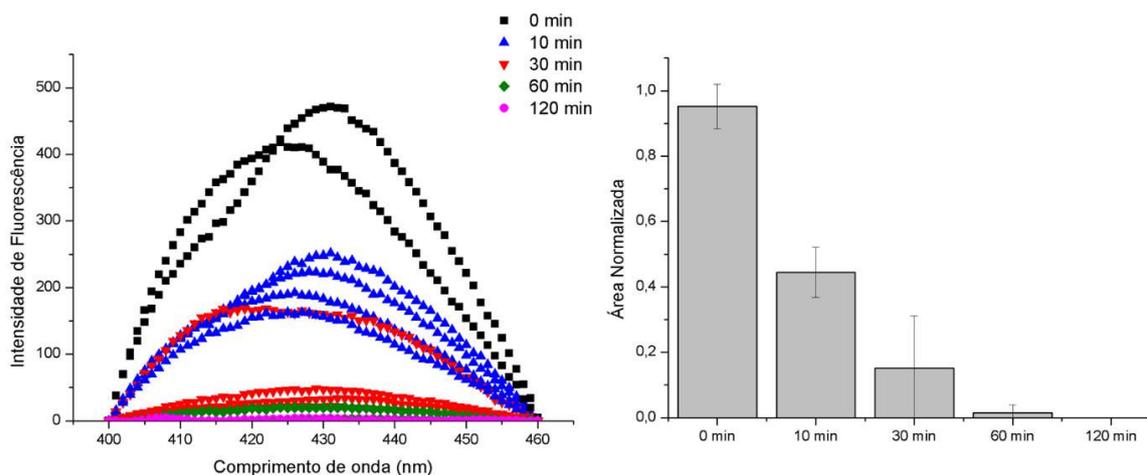


Figura 7.7: Dinâmica das nanopartículas no sangue corrigida e comparação da quantidade de material presente no sangue em cada tempo utilizando-se a área normalizada abaixo de cada curva.

Logo após a injeção, a quantidade de partículas detectada no sangue foi máxima. Após 10 min de circulação, ocorreu diminuição da concentração para cerca de 40% deste valor. Após 30 min de circulação, as partículas ainda podiam ser detectadas, desaparecendo logo depois.

Esse resultado sugere que o organismo apresenta algum mecanismo de remoção das partículas. Segundo BERTRAND e LEROUX (2012), o mecanismo de remoção de sistemas coloidais do organismo depende do tamanho, forma e propriedades superficiais das partículas. Dentre os possíveis mecanismos de remoção e limpeza do organismo algumas suposições podem ser válidas: os rins poderiam ser responsáveis pela filtração do material ou as partículas poderiam ser consumidas durante o metabolismo ou ainda atacadas por macrófagos. É importante ressaltar que as nanopartículas poliméricas não acumulam no organismo aparentemente, tendo em vista que não foram detectadas para tempos longos.

A avaliação da urina dos animais não foi possível pela técnica de fluorescência proposta, uma vez que a amostra de urina apresentou picos de fluorescência em comprimentos de onda que sobrepujavam ao marcador 2-Abz.

MANJUNATH *et al.* (2005) e LUO *et al.* (2011) apresentam estudos de distribuição nos tecidos e biodisponibilidade de nanopartículas lipídicas em modelos animais de ratos e camundongos. Os dois trabalhos mostraram que as partículas são encontradas em maior quantidade nos rins e fígado. O material desenvolvido por MANJUNATH *et al.* (2005) foi encontrado no plasma sanguíneo de ratos até 18 horas após a injeção, numa concentração de 0,05 µg/mL. Já as partículas de LUO *et al.* (2011)

apresentaram tempo de residência média nos órgãos de camundongos de 2 horas, sendo encontradas na concentração de 10 µg/mL.

O curto espaço de tempo em que as nanopartículas são encontradas no organismo representa um desafio para as pesquisas. As propriedades de superfície das nanopartículas, como tamanho, carga e afinidade, apresentam forte influência na interação com as membranas biológicas. Os materiais poliméricos desenvolvidos com o propósito de carreamento de fármacos e liberação sítio-específica precisam ser aprimorados, para garantir maior permanência no organismo.

BERTRAND e LEROUX (2012) descreveram o sangue como um tecido de conexão, responsável pelo transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos no corpo. Após injeção, as partículas interagem com as proteínas presentes no plasma do sangue. Esta interação é guiada pelas propriedades de superfície das partículas e influenciada pelo tempo de circulação e acumulação nos demais tecidos do organismo.

Sabendo que as partículas foram encontradas no sangue do animal em tempos menores (até 30 min), avaliou-se a presença do material em outros órgãos. A preparação de NP-TAT-2Abz e NP-2Abz foi injetada pela via EV, deixando-se circular por 10 min e 30 min. Foram analisados o cérebro, baço, coração e rins. A Figura 7.8 apresenta os perfis obtidos e já corrigidos, conforme descrito anteriormente. Os perfis são apresentados como a média da intensidade de fluorescência obtida para um ensaio com 3 animais para cada preparação e tempos.

Como pode ser observado na Figura 7.8, o perfil corrigido do animal não tratado (controle negativo – CN) apresentou intensidade no intervalo para o cérebro e coração. O valor de área calculado em cada um deles foi subtraído dos demais como um interferente para a comparação posterior.

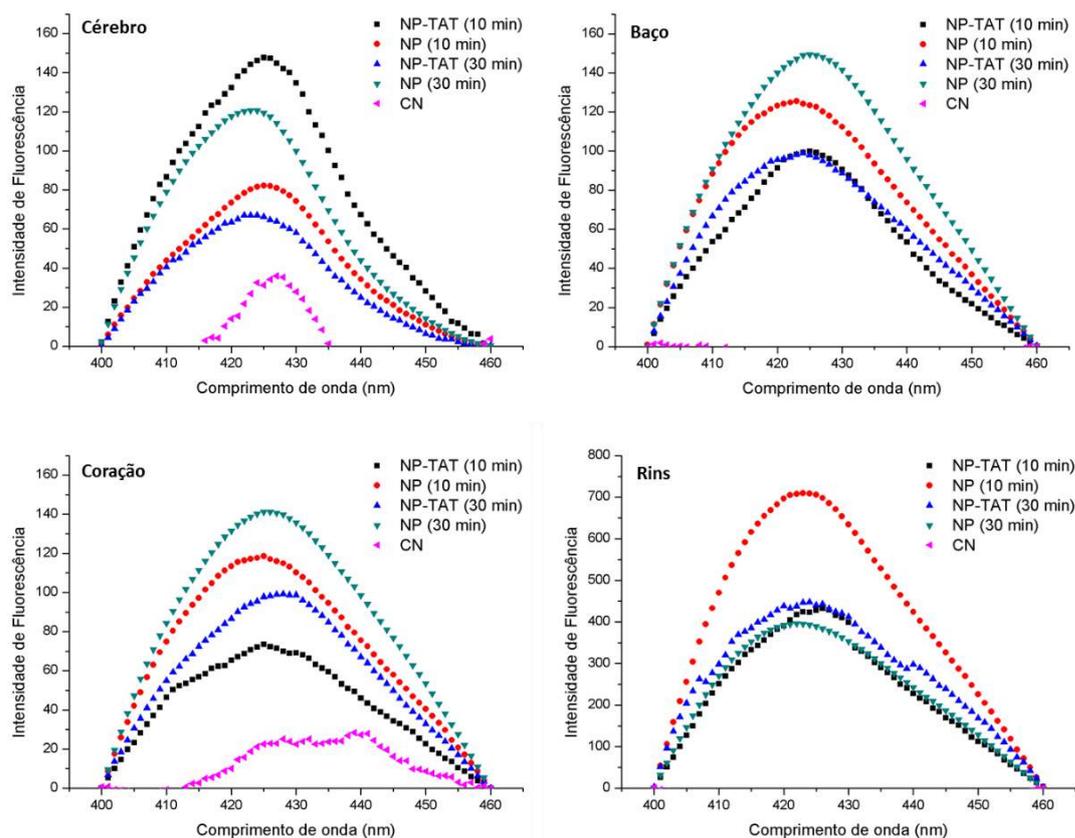


Figura 7.8: Perfis de fluorescência para injeções das preparações NP-TAT-2Abz e NP-2Abz (ambas P(MMA-co-AA) com tempos de circulação de 10 min e 30 min.

Com o intuito de descrever a quantidade de partículas que conseguem alcançar cada um dos órgãos, realizou-se um teste para detectar a máxima fluorescência da preparação em cada tecido avaliado. Assim, um animal não tratado foi dissecado, e os respectivos órgãos preparados. Cada tecido foi contaminado com 100 μ L da amostra (mesmo volume injetado via EV nos animais) e devidamente homogeneizado. Após a leitura dos perfis de máxima intensidade de fluorescência, procedeu-se à normalização dos resultados anteriormente descritos. A Figura 7.9 apresenta a quantificação relativa das nanopartículas em cada órgão avaliado.

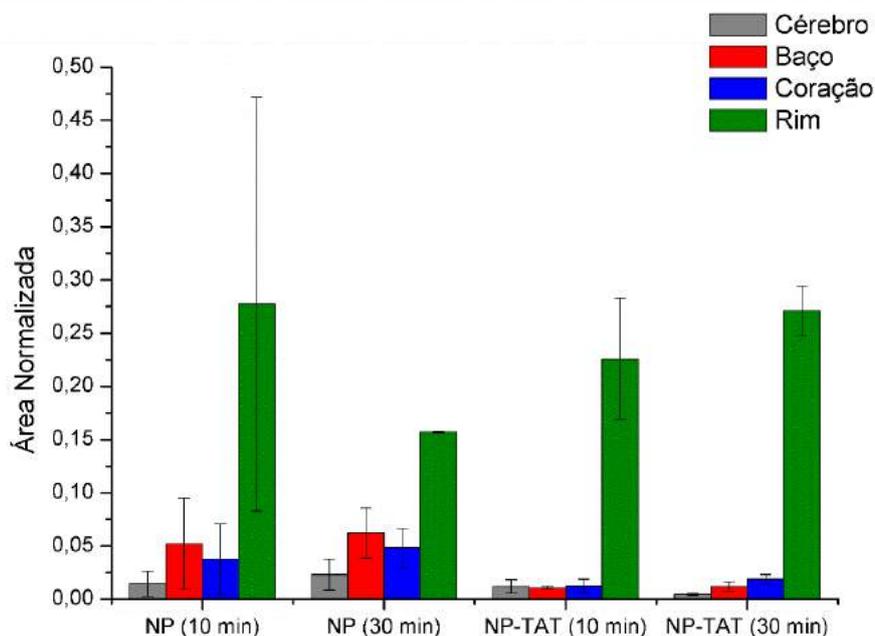


Figura 7.9: Comparação das quantidades de nanopartículas de P(MMA-co-AA) encontradas em cada órgão normalizada pela máxima intensidade de fluorescência.

A Figura 7.9 mostra claramente que todas as partículas são encontradas em maior quantidade nos rins, cerca de 25% da quantidade injetada. É provável que os rins sejam responsáveis pelo mecanismo principal de remoção das partículas poliméricas do organismo do animal. Observa-se ainda uma grande variação dos resultados obtidos para cada animal, tendo em vista as barras de desvio padrão apresentadas, destacando-se a leitura da amostra NP (10 min) nos rins. É possível que este efeito seja devido a alterações de metabolismo e à massa corporal de cada animal.

Na comparação dos tempos de circulação, observa-se diminuição da concentração de partículas em quase todos os órgãos. Este resultado já seria esperado, uma vez que as partículas são removidas do organismo, como mostrado no teste de dinâmica no sangue. Considerando a grande variação dos resultados, verifica-se que as partículas conseguem atingir o cérebro e demais órgãos, independente da presença do peptídeo TAT. Dessa forma, não é possível inferir que a presença do peptídeo TAT possa favorecer a penetração das partículas nas células da BHE.

Preparações com nanopartículas de P(MMA-co-MAA) foram também avaliadas no ensaio de rastreio nos órgãos, tomando como base o procedimento adotado para as partículas do copolímero de AA. Os perfis de fluorescência obtidas, apresentadas na Figura 7.10, mostram que foi possível também detectar a presença das partículas de

P(MMA-co-MAA) nos órgãos estudados, porém em uma quantidade muito menor que as partículas de P(MMA-co-AA), visto os valores de intensidade de fluorescência.

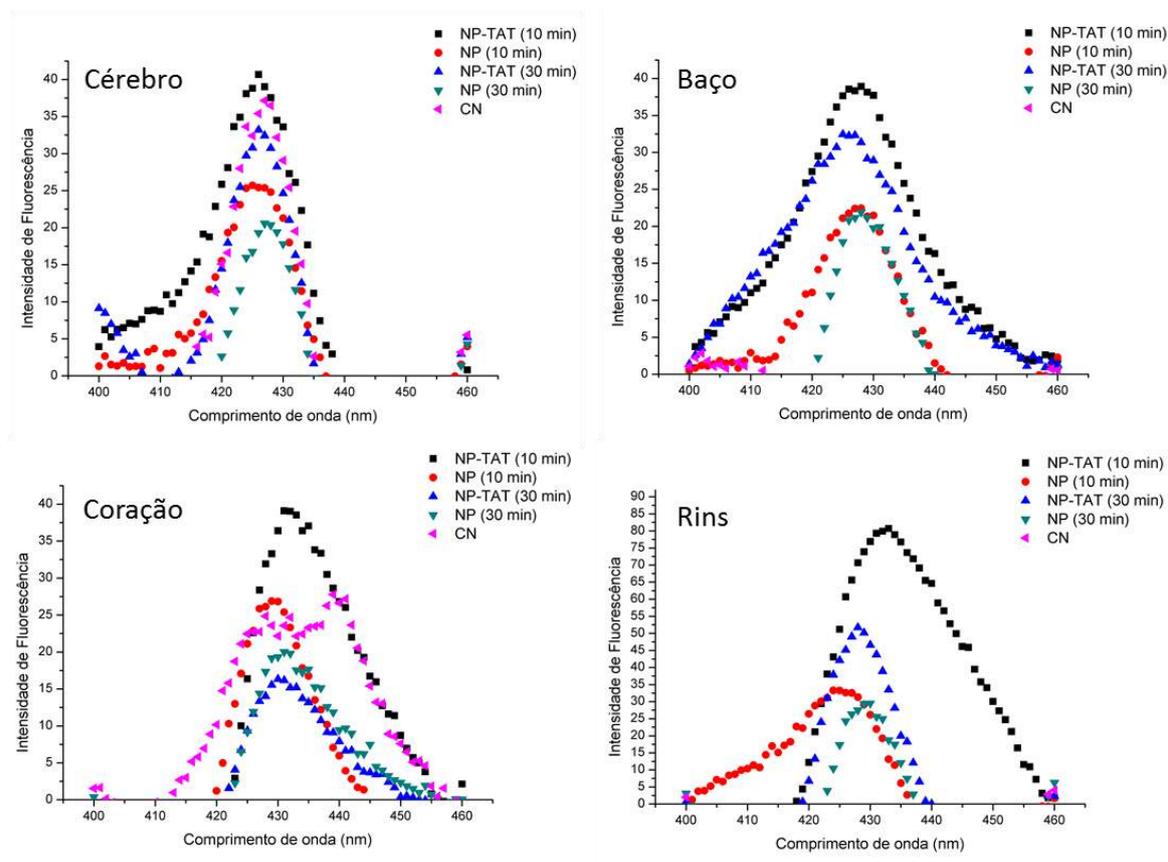


Figura 7.10: Perfis de fluorescência para injeções de partículas de P(MMA-co-MAA) com tempos de circulação de 10 min e 30 min.

A quantificação relativa foi também calculada com base no máximo valor de intensidade que seria detectado, caso toda a preparação injetada conseguisse alcançar o órgão. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 7.11, após procedimento de normalização. Verifica-se que a maior quantidade de partículas foi encontrada nos rins, assim como no experimento anterior. As duas partículas produzidas parecem ter sido encaminhadas para o sistema excretor do animal, sendo posteriormente eliminadas. Observa-se a diminuição da quantidade de partículas nos rins com o tempo. Nos demais órgãos, a quantidade de partículas parece se manter constante no tempo avaliado. As partículas funcionalizadas com o TAT e as partículas não funcionalizadas conseguem atingir o cérebro e demais órgãos de maneira igual, não havendo uma tendência mais favorável com a presença do peptídeo.

Os resultados obtidos pela técnica de detecção por espectrofotômetro de fluorescência conseguiram verificar com clareza a presença das partículas nos órgãos

estudados, quando considerados tempos de circulação de 10 min e 30 min. Dessa forma, é possível concluir que as nanopartículas desenvolvidas apresentam capacidade de penetração nas células dos tecidos, porém sem especificidade somente para as células da BHE. O material pode ser ainda trabalhado de forma a aumentar a sua seletividade para entrega de fármacos no cérebro e possível aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas.

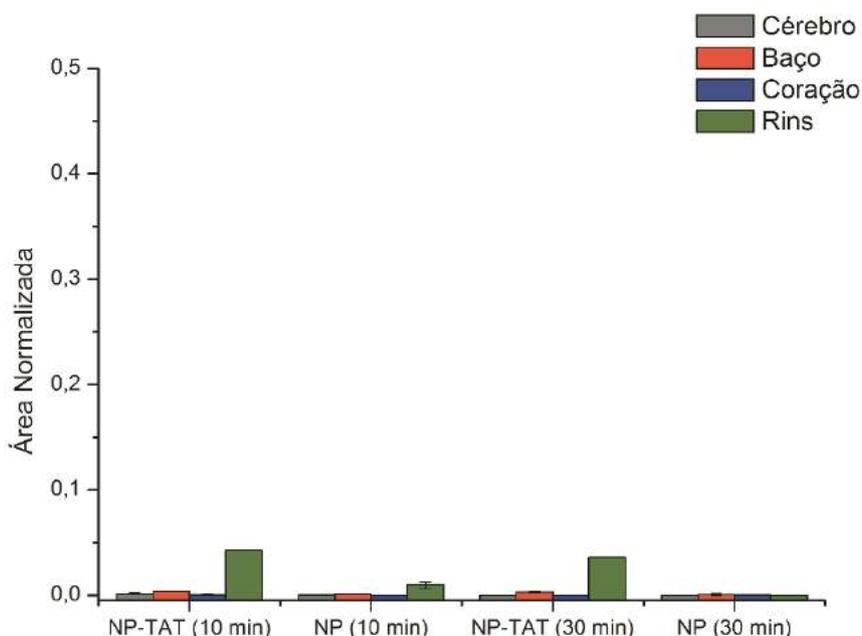


Figura 7.11: Comparação da quantidade de nanopartícula de P(MMA-co-MAA) encontrada em cada órgão normalizada pela máxima intensidade de fluorescência.

7.1.2 Detecção por microscopia

A técnica de microscopia de fluorescência foi também utilizada para verificação das nanopartículas no cérebro dos animais. Os cortes histológicos foram preparados a partir de um animal não tratado (controle negativo), um animal que recebeu injeção intracraniana (controle positivo) e um animal após injeção intraperitoneal e circulação das nanopartículas por 24 horas. As imagens obtidas são mostradas na Figura 7.12.

A imagem do controle negativo mostra a ausência de fluorescência, enquanto que a coloração azul do marcador de fluorescência utilizado e referente à presença de partículas é verificada na imagem do controle positivo. A lâmina do animal que recebeu a preparação de nanopartículas apresenta um fraco sinal de fluorescência, indicando a

presença de raras nanopartículas e se assemelha mais ao controle negativo. Este resultado, porém, não surpreende, tendo em vista o tempo de circulação das partículas no organismo. Como mostrado pelo teste no sangue, as partículas são encontradas no animal somente até 30 min após a injeção., de maneira que as análises de microscopia confirmaram os resultados anteriores.

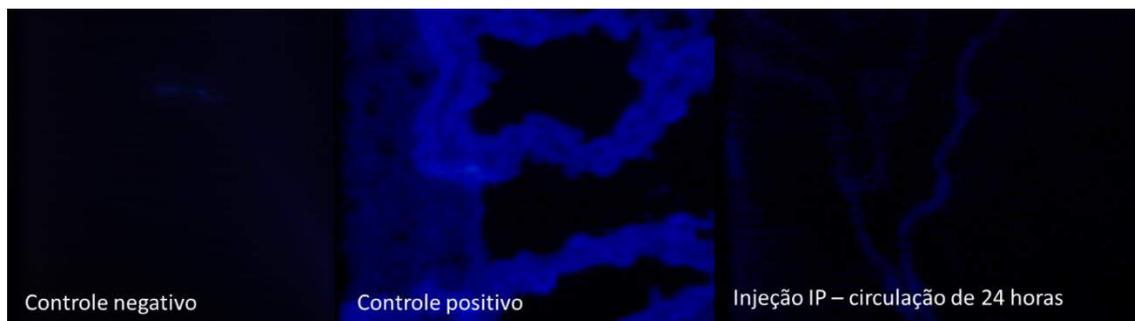


Figura 7.12: Imagens de microscopia dos cortes histológicos dos cérebros.

7.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DIFUSÃO *in vitro*

A citotoxicidade das amostras produzidas foi avaliada a partir da viabilidade celular, utilizando cultura de células Caco-2, que são cultivadas como uma única camada e possuem “*Tight junctions*”. Como controle, o ensaio foi também realizado para o meio de cultura e o meio de cultura diluído em água. Foram avaliadas as nanopartículas de P(MMA-co-AA) (R07), P(MMA-co-AA) CQ (R10) e P(MMA-co-MAA) (R13). Os testes foram realizados em triplicata em dias diferentes, após adequado cultivo das células. A Figura 7.13 apresenta as curvas de viabilidade celular obtidas para cada uma das amostras.

Um trabalho anterior do grupo (PEIXOTO, 2013) mostrou que as nanopartículas de PMMA não apresentam efeitos tóxicos para as células na concentração de até 1750 $\mu\text{g/mL}$, No presente trabalho, o intervalo de concentrações de nanopartículas avaliado variou entre 4 a 8000 $\mu\text{g/mL}$, com o intuito de verificar em qual faixa de concentração o material produzido passa a ser tóxico para as células. A partir dos dados obtidos foi possível calcular a CC50 para cada uma das amostras, mostrada na Tabela 7.2.

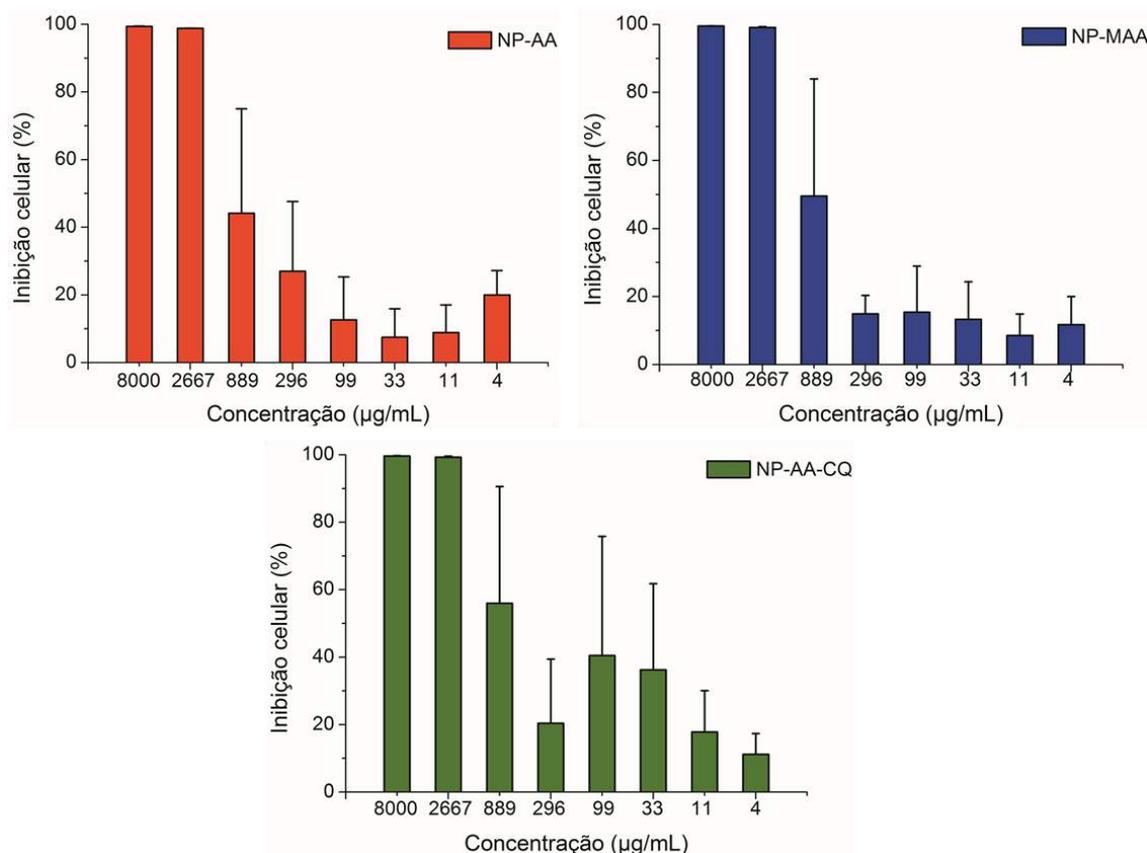


Figura 7.13: Curvas de inibição celular.

Tabela 7.2: CC50 calculada a partir dos resultados de viabilidade celular.

Amostra	CC50 (µg/mL)
P(MMA-co-AA) – NP-AA (R07)	2411
P(MMA-co-AA) CQ – NP-AA-CQ (R10)	1990
P(MMA-co-MAA) – NP-MAA (R13)	1689

As amostras apresentaram CC50 na faixa de 1700 a 2400 µg/mL, sendo nesta concentração verificada morte de 50 % da cultura de células. Os resultados obtidos confirmam os dados reportados por PEIXOTO (2013), uma vez que efeitos tóxicos das nanopartículas foram encontrados apenas em concentrações mais elevadas. A partir da determinação dos efeitos citotóxicos das partículas para as células, iniciou-se o experimento de permeabilidade celular.

No experimento utilizando as câmaras *transwell*, as amostras de nanopartículas diluídas em meio de cultura, na concentração de 100 µg/mL, foram inseridas no compartimento superior das câmaras. A leitura da fluorescência de alíquotas retiradas do compartimento inferior e superior (300 µL) foi realizada após incubação por 4 horas.

Os valores foram corrigidos com base no volume da amostra analisado e são mostrados na Figura 7.14.

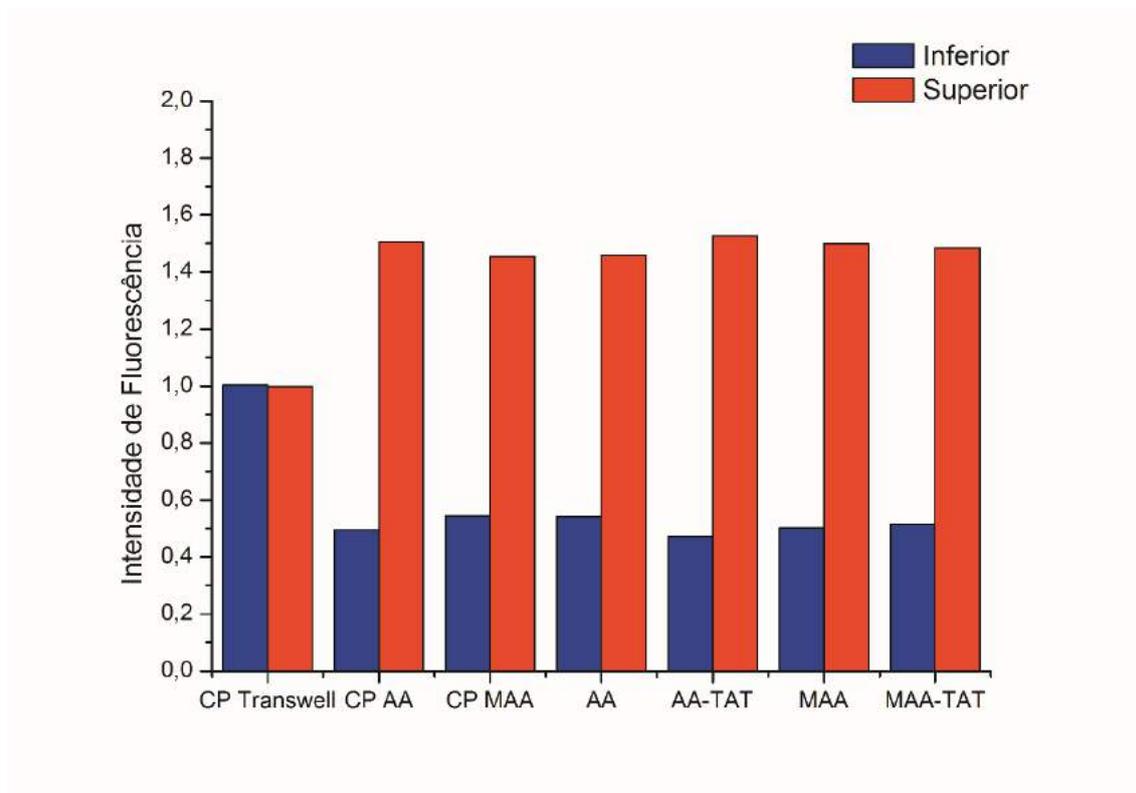


Figura 7.14: Permeabilidade celular a partir da intensidade de fluorescência para as alíquotas retiradas dos compartimentos inferior e superior do suporte *Transwell* após 4 horas de incubação.

Os controles positivos, designados por CP na Figura 7.14, caracterizam a passagem das partículas. No CP *transwell* foram obtidos valores semelhantes de intensidade de fluorescência nos dois compartimentos (uma mistura perfeita), o que mostra que a membrana do suporte não afeta na passagem de partículas. Assim, o transporte é influenciado somente pela camada de células.

As amostras CP AA e CP MAA atingiram valores de intensidade de fluorescência semelhantes no compartimento inferior. Este valor representa a passagem das partículas, já que nestes casos, a camada de células foi tratada para abertura das junções, favorecendo o transporte. Na presença das células, o valor de intensidade encontrado é maior no compartimento superior que o valor de intensidade verificado somente para o suporte. Este dado mostra que as células oferecem uma certa resistência ao transporte.

Os resultados mostram que as partículas dos copolímeros de AA e MAA conseguiram atravessar a camada de células e foram detectadas no compartimento

inferior com intensidades de fluorescência semelhantes aos respectivos controles positivos. A presença do peptídeo TAT parece não interferir no processo de transporte, uma vez que todas as amostras foram capazes de atravessar a camada de células. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, em que não foram encontrados indícios claros do favorecimento da penetração pela presença do peptídeo TAT.

7.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Neste capítulo foram apresentados e discutidos os resultados referentes aos testes realizados para verificação da presença das nanopartículas no cérebro e a capacidade de atravessar barreiras celulares. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* mostraram que o material preparado não apresenta toxicidade para as células, desde que utilizado em concentrações máximas de cerca de 1700 µg/mL. Este valor encontrado corrobora com resultados já reportados por estudos do grupo de pesquisa utilizando-se partículas semelhantes. Além disso, os ensaios de difusão celular apontaram para a capacidade das partículas de penetrar uma barreira celular. Os resultados mostraram que todas as amostras conseguiram permear o sistema de forma igual. Os ensaios *in vivo* mostraram que as nanopartículas apresentam um tempo de meia-vida curto no organismo, sendo removidas em um tempo de cerca de 30 minutos da circulação. O teste de bio-distribuição mostrou que as partículas se distribuem de forma diferente nos órgãos estudados e que o perfil de distribuição é também influenciado pela composição do polímero. As partículas de P(MMA-co-AA) conseguiram alcançar todos os órgãos e foram encontradas principalmente nos rins. Já as partículas de P(MMA-co-MAA) não foram encontradas nos órgãos estudados. Os resultados dos testes realizados se complementam e sugerem que a presença do peptídeo de penetração celular não favoreceu o transporte das partículas. Dessa forma, faz necessário o estudo da modificação da superfície das partículas para aumentar o tempo de residência e garantir a especificidade do transporte.

Capítulo VIII

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de doutorado propôs o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas produzidas via polimerização em miniemulsão para a encapsulamento de fármacos e aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas, admitindo-se capacidade de permeação na barreira hematoencefálica. O caráter multidisciplinar do trabalho permitiu estudos, aprofundamento e vivência em diversas áreas.

Visando ao cumprimento dos objetivos propostos neste trabalho, algumas metas puderam ser estabelecidas: selecionar os polímeros mais adequados à produção das nanopartículas e encapsulamento do fármaco, garantindo a manutenção da atividade; avaliar as melhores condições da reação de polimerização, para obter partículas com distribuição de tamanhos e propriedades superficiais adequadas à funcionalização; e avaliar a especificidade do transporte e liberação do fármaco.

A polimerização em miniemulsão foi a técnica escolhida para a produção das partículas poliméricas, uma vez que permite a encapsulamento de agentes terapêuticos durante a reação, com altas eficiências. Foram estudadas as reações de polimerização do monômero metacrilato de metila e copolimerizações com ácido acrílico ou ácido metacrílico. As reações apresentaram uma cinética rápida, como previsto para o sistema via radicais livres, e altas conversões. Além disso, foram produzidos sistemas com massa molar em torno de 1800 kDa. Os materiais produzidos apresentaram diâmetros médios que variaram entre 60 e 100 nm e a avaliação por microscopia mostrou a formação de partículas uniformes e esféricas. Estas características são desejáveis para a aplicação pretendida. A inserção de grupos ácidos ao polímero foi realizada com sucesso, de acordo com os resultados de RMN, análises térmicas e ângulo de contato obtidos. Estes grupos foram posteriormente utilizados em reações de funcionalização da superfície das partículas.

As partículas produzidas na presença do fármaco clioquinol apresentaram características semelhantes às demais, o que as torna aptas para o transporte de

fármaco no organismo. Além disso, o clioquinol foi encapsulado no sistema polimérico com eficiência maior que 97 %.

Os testes de liberação do fármaco foram realizados em sistemas que simulavam as condições de temperatura e pH do organismo. Os resultados obtidos mostraram que o clioquinol é liberado de forma lenta e gradual a partir das nanopartículas do copolímero de P(MMA-co-AA). Em 9 horas de teste foi liberado cerca de 50 % do fármaco encapsulado.

Em relação aos ensaios de funcionalização, foram inicialmente utilizadas moléculas modelo, como a proteína BSA e o aminoácido lisina, como tentativa de desenvolver a metodologia para imobilização do peptídeo de interesse, o TAT. Para a imobilização foi escolhida uma rota química de adsorção, levando à formação de uma ligação covalente do tipo amida entre os grupos ácidos inseridos no polímero suporte e os grupos amino disponíveis no ligante. Os resultados mostraram que a funcionalização das partículas com BSA ocorreu por interações não específicas, que são fracas e facilmente desfeitas, o que pode resultar em dessorção nas condições de aplicação. Por outro lado, o aminoácido lisina foi ligado com sucesso à superfície das partículas com formação de ligações químicas, confirmadas por espectroscopia FTIR e por RMN. Ensaios de dessorção evidenciaram a presença do aminoácido lisina, mesmo após sucessivos procedimentos de lavagem do material. A imobilização covalente do peptídeo TAT foi realizada com sucesso, com base na metodologia previamente desenvolvida, sendo este conjugado às partículas numa razão de 0,4 mg de TAT por área superficial (m^2) de nanopartícula.

Para a etapa de avaliação da permeação das partículas funcionalizadas na BHE, foi necessária a introdução de marcador de fluorescência na preparação, de modo que as partículas pudessem ser identificadas ao alcançarem o cérebro. Os resultados das análises de fluorescência mostraram que as partículas se distribuem no organismo, sendo encontradas também no cérebro. Assim, o sistema desenvolvido consegue alcançar os órgãos, mas não com especificidade para atravessar somente a BHE. Não foi possível concluir que a presença do peptídeo TAT favoreça a penetração das partículas nos tecidos. É importante ressaltar também a rápida remoção das nanopartículas poliméricas no organismo dos animais, o que constitui um grande desafio para as pesquisas na área de liberação de fármacos a partir de dispositivos nanométricos. Além de permitir a disponibilização do fármaco no local específico de ação, é necessário garantir também que o sistema permaneça no organismo por tempo suficiente.

Os ensaios de citotoxicidade permitiram detectar a faixa de concentração em que as partículas não apresentam efeitos tóxicos para células, ficando esta em 1700

µg/mL. A avaliação da difusão e permeabilidade in vitro mostrou que as partículas estudadas conseguem atravessar a camada de células e que a camada de células representa uma resistência ao transporte.

As nanopartículas poliméricas desenvolvidas apresentam potencial aplicação para o tratamento de doenças. O desenvolvimento futuro de sistemas destinados ao tratamento de doenças que acometem o sistema nervoso central deve focar em melhorar seu desempenho em atravessar as barreiras de proteção e especificidade, utilizando novos vetores de direcionamento, aumentando a permeabilidade e reduzindo possíveis efeitos de neurotoxicidade.

8.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento de um sistema de nanopartículas eficiente e seguro aplicado ao tratamento de doenças que acometem o sistema nervoso central constitui um desafio, de maneira que a pesquisa nesta área é extremamente importante. Novos trabalhos representam mais um passo no avanço científico e os resultados irão complementar aqueles já expostos nesta tese. Sugestões para continuação da pesquisa e trabalhos futuros são citadas a seguir:

- Muito se discute a respeito da utilização de polímeros biodegradáveis para a concepção de sistemas com aplicações biomédicas. Neste ponto, seria interessante avaliar a produção das nanopartículas a partir de polímeros biodegradáveis, como poli(ácido lático) (PLA) e poli(cianoacrilato de butila) (PBCA) e estudar o processo de degradação destes materiais no organismo.
- Os polímeros são materiais versáteis e permitem sua modificação a partir da inserção de grupos funcionais, dando origem a novas possibilidades de funcionalização. A copolimerização, utilizando outros comonômeros, pode ser avaliada, a fim de permitir a inserção de variados grupos funcionais e posterior utilização dos materiais em reações de imobilização.
- Neste trabalho, somente a encapsulamento do fármaco modelo clioquinol foi investigada. Outras moléculas podem ser também estudadas e utilizadas em sistemas de liberação a partir de nanopartículas. Dessa forma, sugere-se avaliar a encapsulamento e o perfil de liberação de um fármaco já aplicado ao tratamento da doença de Alzheimer, como a rivastigmina. Além disso, as partículas produzidas podem ser testadas em modelos animais com doenças

neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer ou doença de Parkinson, como forma de avaliar seu efeito nas células do sistema nervoso central.

- Em relação ao perfil de liberação do fármaco, os resultados mostraram que durante o tempo de teste avaliado nem todo o fármaco contido na matriz polimérica foi extraído para o meio de liberação. Sugere-se que estes testes sejam realizados por períodos prolongados, a fim de traçar um perfil cinético mais detalhado e completo. Além disso, pode-se estudar mudanças na estrutura do polímero, com a adição de grupos sensíveis a estímulos, como temperatura e pH, a fim de favorecer a difusão das moléculas de fármaco e liberação.
- A metodologia para funcionalização das partículas com EDC desenvolvida neste trabalho é simples e mostrou-se versátil, podendo ser aplicada também a outros ligantes. Assim, outros peptídeos de penetração celular e proteínas podem ser investigados, fornecendo novos trabalhos de funcionalização e avaliação da aplicação pretendida.
- A etapa de avaliação da permeação da BHE por meio de experimentos *in vivo* foi extremamente importante e contribuiu com resultados efetivos para esta tese. Além disso permitiu uma nova vivência laboratorial, com procedimentos específicos e manuseio de animais, enriquecendo ainda mais este trabalho. Continuar e consolidar a parceria com professores da Faculdade de Farmácia é imprescindível para as futuras pesquisas na área de polímeros com aplicação biomédica. Estudos quantitativos também são necessários para completar estes resultados e fornecerem potencial aplicação do sistema em concepção. A toxicidade dos materiais poliméricos pode ser também avaliadas por ensaios *in vivo*.
- Outras aplicações para as nanopartículas funcionalizadas podem ser também investigadas, como a internalização em células tronco. Neste caso, as nanopartículas poderiam ser utilizadas para potencializar a terapia celular, permitindo a regeneração do tecido e a liberação de um fármaco de maneira conjunta.

Capítulo IX

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A. K.; DOLMAN, D. E. M.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J.; “Structure and function of the blood–brain barrier.” **Neurobiology of Disease**. v. 37, p. 13-25, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Resolução nº 899 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, 29 de maio de 2003**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Esclarecimentos sobre a aplicação da RE Nº 899 – Validação de Métodos Bioanalíticos**. Brasília, DF, 2008.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K.; “Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport.” **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 46, p. 27-43, 2001.

ASTM. **Standard Terminology Relating to Nanotechnology**. Active Standard ASTM E2456, 2012.

ANAND, P.; O’NEIL, A.; LIN, E.; DOUGLAS, T.; HOLFORD, M.; “Tailored delivery of analgesic ziconotide across a blood brain barrier model using viral nanocontainers.” **Nature - Scientific Reports**. v. 5, p. 10, 2015.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K.; “Polyreactions in miniemulsions.” **Progress in Polymer Science**. v. 27, p.689-757, 2002.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S.; “Nanoparticles in the clinic.” **Bioengineering and Translational Medicine**. v. 1, p. 10-29, 2016.

ASUA, J. M.; “Miniemulsion polymerization.” **Progress in Polymer Science**. v. 27, p.1283-1396, 2002.

AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D.; “Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas.” **Revista Brasileira de FARMACIA**. v. 90, p. 321-326, 2009.

BALAKRISHNAN, A.; REGE, B. D.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; “Surfactant-mediated dissolution: contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity.” **Journal of pharmaceutical sciences**. v. 93, p. 2064-2075, 2004.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M.; “The blood–brain barrier: an overview structure, regulation, and clinical implications.” **Neurobiology of Disease**. v.16, p. 1-13, 2004.

BANKS, W. A.; “Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood–brain barrier.” **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 629-639, 2012.

BASSYOUNI, F.; ELHALWANY, N.; REHIM, M. A.; NEYFEH, M.; “Advances and new technologies applied in controlled drug delivery system.” **Research on Chemical Intermediates**. v. n/a, p. n/a, 2013.

BBC Research Healthcare Report, Nanotechnology in Medical Applications: The Global Market. 2015. Disponível em: <http://www.bccresearch.com>. Acesso em 14 de julho de 2017.

BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J.; “A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems.” **International Journal of Pharmaceutics**. v. 388, p. 287-294, 2010.

BEGLEY, D. J.; “Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities.” **Pharmacology & Therapeutics**. v. 104, p. 29-45; 2004.

BERTRAND, N.; LEROUX, J. C.; “The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective.” **Journal of Controlled Release**. v. 161, p. 152-163, 2012.

BICKER, J.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A.; “Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review.” **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 87, p. 409-432, 2014.

BRADFORD, M. M.; “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H.; GRULKE, E. A.; **Polymer Handbook**, 4 ed, John Wiley, New York, 1999.

BROWN, C. K.; “Dissolution Method Development: An Industry Perspective”, In: DRESSMAN, J.; KRAMER, J.; **Pharmaceutical Dissolution Testing**, Boca Raton, FL. Taylor & Francis Group, 2005.

BUTT, H.; GRAF, K.; KAPPL, M.; **Physics and Chemistry of Interfaces**, Alemanha, Wiley VCH, 2003.

CALVO, P.; GOURITIN, B.; CHACUN, H.; DESMAELE, D.; D'ANGELO, J.; NOEL, J.; GEORGIN, D.; FATTAL, E.; ANDREUX, J. P.; COUVREUR, P.; “Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery.” **Pharmaceutical Research**. v. 18, p. 1157-1166, 2001.

CARDOSO, F. L.; BRITES, D.; BRITO, M. A.; “Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches.” **Brain Research Reviews**. v. 64, p. 328-363, 2010.

CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; ZAIONCZ, S.; OLIVEIRA, A. R. S.; ALMEIDA, M. C. R.; ZAWADZKI, S. F.; AKCELRUD, L.; AGUIAR, M.; TABAK, D.; LUCAS, E. F.; “Síntese de Copolímeros Metacrílicos Através da Modificação Química do Poli(Metacrilato de Metila) de Massa Molar Controlada.” **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. n/a, p. n/a, 1999.

CIOBANASU, C.; SIEBRASSE, J. P.; KUBITSCHECK, U.; “Cell-Penetrating HIV1 TAT Peptides Can Generate Pores in Model Membranes”. **Biophysical Journal**. v. 99, p. 153-162, 2010.

CHEN, Y.; LIU, L.; “Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier.” **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 640-665, 2012.

CHENG, K. K.; CHAN, P. S.; FAN, S.; KWAN, S. M.; YEUNG, K. L.; WANG, Y. J.; CHOW, A. L.; WU, E.; BAUM, L.; “Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for

detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging." **Biomaterials**. v. 44, p. 155-175, 2015.

CHHALOTIYA, U. K.; BHATT, K. K.; SHAH, D. A.; BALDANIA, S. L.; PATEL, M. R.; "Quantification of Clioquinol in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms by Stability Indicating LC Method." **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.11, p. 67-78, 2014.

COLOMBO, C.; LUPI, M.; UBEZO, P.; MOSCATELLI, D.; "Cytotoxicity of PMMA-Based Nanoparticles Synthesized Adopting SDS and Tween 80." **Macromolecular Symposia**. v. 324, p. 134-139, 2013.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S.; "Modeling and comparison of dissolution profiles." **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 13, p. 123-133, 2001.

COSTANTINO, L.; GANDOLFI, F.; TOSI, G.; RIVASI, F.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F.; "Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood–brain barrier." **Journal of Controlled Release**. v. 108, p. 84- 96, 2005.

CRESPY, D.; LANDFESTER, K.; "Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers". **Beilstein Journal of Organic Chemistry**. v. 6, p. 1132-1148, 2010.

DAVIES B.; MORRIS, T.; "Physiological parameters in laboratory animals and humans." **Pharmaceutical Research**. v. 10, p. 1093-1095, 1993.

EHRENBERG, M. S.; FRIEDMAN, A. E.; FINKELSTEIN, J. N.; OBERDORSTER, G.; McGRATH, J. L.; "The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells." **Biomaterials**. v. 30, p. 603-610, 2009.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L.; "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications." **Chemical Society Reviews**. v. 41, p. 2545-2561, 2012.

EUROPEAN COMMISSION. **Second Regulatory Review on Nanomaterials**. Communication from the commission to the european parliament, the council and the european economic and social committee, p. 2-15, 2012.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Clioquinol**. In European Pharmacopoeia 5.0 5 ed. 2005.

FAASSEN, F.; VOGEL, G.; SPANINGS, H.; VROMANS, H.; “Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs.” **International Journal of Pharmaceutics**. v. 263, p. 113-122, 2003

FEUSER, P. E.; GASPAR, P. C.; RICCI-JÚNIOR, E.; SILVA, M. C. S.; NELE, M.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H.; “Synthesis and Characterization of Poly(Methyl Methacrylate) PMMA and Evaluation of Cytotoxicity for Biomedical Application.” **Macromolular Symposia**. v. 343, p. 65-69, 2014.

FONSECA, L. B.; NELE, M.; VOLPATO, N. M.; SEICEIRA, R. C.; PINTO, J. C.; “Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through “In Situ” Miniemulsion Polimerization” **Macromolecular Reaction Engineering**. v. 7, p. 54-63, 2013.

FU, Y.; KAO, W. J.; “Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Nondegradable and Degradable Polymeric Delivery Systems.” **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 7, p. 429-444, 2010.

GANDHI, A.; JANA, S.; SEN, K. K.; “In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO® nanoparticles for sustained drug delivery.” **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 67, p. 478-482, 2014.

GARTZIANDIA, O.; EGUSQUIAGUIRRE, S. P.; BIANCO, J.; PEDRAZ, J. L.; IGARTUA, M.; HERNANDEZ, R. M.; PRÉAT, V.; BELOQUI, A.; “Nanoparticle transport across in vitro olfactory cell monolayers.” **International Journal of Pharmaceutics**. v.499, p. 81-89, 2016.

GELAMO, E.L.; SILVA, C.H.T.P.; IMASATO, H.; TABAK, M.; “Interaction of Bovine (BSA) and Human (HSA) Serum Albumins with Ionic Surfactants: Spectroscopy and Modelling.” **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1594, p. 84-92, 2002.

GRAÇA, D.; LOURO, H.; SANTOS, J.; DIAS, K.; ALMEIDA, J. A.; GONÇALVES, L.; SILVA, M. J.; BETTENCOURT, A.; “Toxicity screening of a novel

poly(methylmethacrylate)-Eudragit

nanocarrier on L929 fibroblasts.” **Toxicology Letters**. v. 276, p. 129-137, 2017.

GUZIOR, N.; WIECKOWSKA, A.; PANEK, D.; MALAWSKA, B.; “Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer’s Disease.” **Current Medicinal Chemistry**. v. 22, p. 373-404, 2015.

HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P.K.; **Immobilized Affinity Ligand Techniques**. 1 ed., San Diego, Academic Press, Inc., 1992.

HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K.; LORENZ, M. R.; MAILANDER, V.; “Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells.” **Macromolular Chemistry and Physics**. v. 206, p. 2440-2449, 2005.

HORIE, K.; BARÓN, M.; FOX, R. B.; HE, J.; HESS, M.; KAHOVEC, J.; KITAYAMA, T.; KUBISA, P.; MARÉCHAL, E.; MORMANN, W.; STEPTO, R. F. T.; TABAK, D.; VOHLÍDAL, J.; WILKS, E. S.; WORK, W. J.; “Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric Materials. IUPAC Recommendations, 2003.” **Pure Applied Chemistry**. v. 76, p. 889-906, 2004.

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**. v. 76, p. 189-199, 2010.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J.; “O encéfalo que envelhece”, In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J.; **Princípios de Neurociências**, 5 ed, Porto Alegre, AMGH Editora Ltda, 2014.

KANWAR, J. R.; SUN, X.; PUNJ, V.; SRIRAMOJU, B.; MOHAN, R. R.; ZHOU S.; CHAUHAN, A.; KANWAR, R. K.; “Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal.” **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 8, p. 399-414, 2012.

KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I.C.; PARK, K.; “Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery.” **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 71, p. 420-430, 2009.

KREUTER, J.; “Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs.” **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 47, p. 65-81, 2001.

KREUTER, J.; SHAMENKOV, D.; PETROV, V.; RAMGE, P.; CYCHUTEK, K.; KOCH-BRANDT, K.; ALYAUDIN, R.; “Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood–Brain Barrier.” **Journal of Drug Targeting**. v.10, p. 317-325, 2002.

KREUTER, J.; RAMGE, P.; PETROV, V.; HAMM, S.; GELPERINA, S. E.; ENGELHARDT, B.; ALYAUDIN, R.; VON BRIESEN, H.; BEGLEY, D.; “Direct Evidence that Polysorbate-80-Coated Poly(Butylcyanoacrylate) Nanoparticles Deliver Drugs to the CNS via Specific Mechanisms Requiring Prior Binding of Drug to the Nanoparticles.” **Pharmaceutical Research**. v. 20, p. 409-416, 2003.

KREUTER, J.; HEKMATARA, T.; DREIS, S.; VOGEL, T.; GELPERINA, S.; LANGER, K.; “Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain.” **Journal of Controlled Release**. v.118, p. 54-58, 2007.

KREUTER, J.; “Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier (BBB).” **Journal of Microencapsulation**. v. 30, p. 49-54, 2013.

KREUTER, J.; “Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know?” **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 71, p. 2-14, 2014.

LANDFESTER, K.; “Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles.” **Angewandte Chemie International Edition**. v. 48, p. 4488 – 4507, 2009.

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C.; VANKATRAMAN, S. S.; “Modeling of drug release from bulk-degrading polymers.” **International Journal of Pharmaceutics**. v. 418, p. 28-41, 2011.

LI, S.; HU, J.; LIU, B.; “A study on the adsorption behavior of protein onto functional microspheres.” **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 80, p. 531-536, 2005.

LIN, P.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R.; “Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials.” **Biotechnology Advances**. v. 32, p. 711-726, 2014.

LIU, L.; GUO, K.; LU, J.; VENKATRAMAN, S. S.; LUO, D.; NG, K. C.; LING, E.; MOOCHHALA, S.; YANG, Y.; “Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier.” **Biomaterials**. v. 29, p. 150-1517, 2008.

LORCA, B. S. S.; BESSA, E. S.; NELE, M.; SANTOS, E. P.; PINTO, J. C.; “Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization.” **Macromolecular Symposia**. v. 319, p. 246-250, 2012.

LUO, C.; YUAN, M.; CHEN, M.; LIU, S.; ZHU, L.; HUANG, B.; LIU, X.; XIONG, W.; “Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid lipid nanoparticles following oral administration.” **International Journal of Pharmaceutics**. v. 410, p. 138-144, 2011.

MACHADO, D. F.; **Biossensores impressos baseados em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2015. Dissertação.

MAHON, E.; SALVATI, A.; BOMBELLI, F. B.; LYNCH, I.; DAWSON, K. A.; “Designing the nanoparticle–biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”.” **Journal of Controlled Release**. v. 161, p. 164-174, 2012.

MALHOTRA, M.; PRAKASH, S.; “Targeted Drug Delivery Across Blood-Brain-Barrier Using Cell Penetrating Peptides Tagged Nanoparticles.” **Current Nanoscience**. v. 7, p. 81-93, 2011.

MALHOTRA, M.; TOMARO-DUCHESNEAU, T.; PRAKASH, S.; “Synthesis of TAT peptide-tagged PEGylated chitosan nanoparticles for siRNA delivery targeting neurodegenerative diseases.” **Biomaterials**. v. 34, p. 1270-1280, 2013.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V.; “Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration.” **Journal of Controlled Release**. v. 107, p. 215-228, 2005.

MAO, X.; SCHIMMER, A. D.; “The toxicology of clioquinol.” **Toxicology Letters**. v. 182, p. 1–6, 2008.

MEHNERT, W.; MADER, K.; “Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications.” **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83–101, 2012.

MEHRAVAR, E.; ITURROSPE, A.; ARBE, A.; ASUA, J. M.; LEIZA, J. R.; “Phase behavior of side-chain liquid-crystalline polymers containing biphenyl mesogens with different spacer lengths synthesized via miniemulsion polymerization.” **Polymer Chemistry**. v. 7, p. 4736-4750, 2016.

MENDES, A. N.; FILGUEIRAS, L. A.; SIQUEIRA, M. R. P.; BARBOSA, G. M.; HOLANDINO, C.; MOREIRA, D. L.; PINTO, J. C.; NELE, M.; “Encapsulation of *Piper cabralanum* (Piperaceae) nonpolar extract in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells.” **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, p. 8363-8373, 2017.

MENDES, A. N.; HUBBER, I.; SIQUEIRA, M.; GLEYCE, M. B.; MOREIRA, D. L.; HOLANDINO, C.; PINTO, J. C.; NELE, M.; “Preparation and Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles for Drug Encapsulation.” **Macromolecular Symposia**, v. 319, p. 34–40, 2012.

MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; “Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology.” **Annals of the New York Academy of Science**. v. 1184, p. 154-172, 2010.

MOREIRA, T. S.; OLIVEIRA, M. A. M.; LIMA, L. M. T. R.; SOUZA, M. N.; PINTO, J. C.; “Synthesis of Nanoparticles Loaded with Tamoxifen by in Situ Miniemulsion RAFT Polymerization”. **Macromolecular Symposia**. v. 344, p. 101-107, 2014.

MOREIRA, T. S., **Síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização radicalar (RAFT) para vetorização biodirigida de tamoxifeno**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2015. Tese.

MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K.; “Polymer Micro - and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties.” **Macromolecular Bioscience**. v 14, 458-477, 2014.

NATARAJAN, J. V.; NUGRAHA, C.; NG, X. W.; VENKATRAMAN, S.; “Sustained-release from nanocarriers: a review.” **Journal of Controlled Release**. v.193, p. 122-138, 2014.

NICOLAS, J.; MURA, S.; BRAMBILLA, D.; MACKIEWICZ, N.; COUVREUR, P.; “Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery.” **Chemical Society Reviews**. v. 42, p. 1147-1235, 2013.

NICOLINI, J. V.; **Biossensores baseados em nanotubos de titanato e peroxidase para detecção do peróxido de hidrogênio**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2013. Dissertação.

NIST - National Institute of Standards and Technology. Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.6028/NIST.SP.1200-6>. Acesso em 29 de fevereiro de 2016.

OLIVEIRA, M. A. M.; NELE, M.; PINTO, J. C.; “Polimerização RAFT em miniemulsão.” **Polímeros**. v. 23, p. 784-794, 2013.

OLIVIER, J. C.; FENART, L.; CHAUVET, R.; PARIAT, C.; CECHELLI, R.; COUET, W.; “Indirect Evidence that Drug Brain Targeting Using Polybutyrylcyanoacrylate Nanoparticles is Related to Toxicity.” **Pharmaceutical Research**. v. 16, p. 1836-1842, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; **Dementia: a public health priority**. 2012.

ORÉFICE, R. L.; “Materiais Poliméricos: Ciência e Aplicação como Biomateriais”, In: ORÉFICE, R.; PEREIRA, M.; MANSUR, H.; **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**, 1. ed., 1. reimpr., Rio de Janeiro, Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012.

PARK, K.; “Controlled drug delivery systems: Past forward and future back.” **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3-8, 2014.

PATEL, T.; ZHOU, J.; PIEPMEIER, J. M.; SALTZMAN, W. M.; "Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system." **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 701-705, 2012.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S.; "Curso de Manipulação de Animais de Laboratório." **Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz**, Salvador, BA, 2005.

PAIVA, T.; MELO JR, P.; PINTO, J. C.; "Comparative Analysis of Sunscreen Nanoencapsulation Processes". **Macromolecular Symposia**, v. 368, p. 60-69, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.; **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed., cap. 2, Belmont, USA, Brooks/Cole Cengage Learning, 2009.

PEIXOTO, A. C. B.; **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2013. Dissertação.

PEIXOTO, A. C. B.; CAMPOS, I. M. F.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C.; "Use of hydrophilic monomers to avoid secondary particle nucleation in miniemulsion polymerizations of methyl methacrylate." **Journal of Applied Polymer Science**, v. 5, p. 60-71, 2016.

PICHOT, C.; "Surface-functionalized latexes for biotechnological applications." **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 213-221, 2004.

PINTO, M. C.; FREIRE, D. M.; PINTO, J. C.; "Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*". **Molecules (Basel. Online)**, v. 19, p. 12509-12530, 2014.

PubChem: Open Chemistry Database. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2788#section=Absorption-Distribution-and-Excretion>. Acesso em 05 de agosto de 2015.

RAGNAILL, M. N.; BROWN, M.; YE, D.; BRAMINI, M.; CALLANAN, S.; LYNCH, I.; DAWSON, K. A.; " Internal benchmarking of a human blood–brain barrier cell model for screening of nanoparticle uptake and transcytosis." **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 77, p. 360-367, 2011.

RAO, K. S.; REDDY, M. K.; HORNING, J. L.; LABHASETWAR, V.; "TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs." **Biomaterials**. v. 29, p. 4429-4438, 2008.

RAWAT, A.; BURGESS, D. J.; "USP apparatus 4 method for in vitro release testing of protein loaded microspheres." **International Journal of Pharmaceutics**. v. 409, p. 178-184, 2011.

RITCHIE *et al.*, "Metal-Protein Attenuation with Iodochlorhydroxyquin (Clioquinol) Targeting AB Amyloid Deposition and Toxicity in Alzheimer Disease." **Archives Neurology**. v. 60, p. 1685-1691, 2003.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. A.; "Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico." **Química Nova**, v. 30, p. 1026-1031, 2007.

RODDA, A. E.; MEAGHER, L.; NISBET, D. R.; FORSYTHE, J. S.; "Specific control of cell-material interactions: Targeting cell receptors using ligand-functionalized polymer substrates." **Progress in Polymer Science**. v. 39, p. 1312-1347, 2014.

RODRIGUES, D. C. Q.; **Encapsulamento de agentes inibidores de corrosão para liberação gradual em poços de petróleo**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017. Dissertação.

RODRIGUEZ, F.; COHEN, C.; OBER, C. K.; ARCHER, L. A.; **Principles of polymer systems**. 5 ed., New York, USA, CRC Press, 2003.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D.; "Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz." **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 23, p. 222-227, 2011.

RONEY, C.; KULKARNI, P.; ARORA, V.; ANTICH, P.; BONTE, F.; WU, A.; MALLIKARJUANA, N. N.; MANOHAR, S.; LIANG, H.; KULKARNI, A. R.; SUNG, H.; SAIRAM, M.; AMINABHAVI, T. M.; "Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease." **Journal of Controlled Release**. v. 108, p. 193-214, 2005.

ROOY, I.; CAKIR-TASCIOGLU, S.; HENNINK, W. E.; STORM, G.; SCHIFFERLERS, R. M.; MASTROBATTISTA, E.; “In Vivo Methods to Study Uptake of Nanoparticles into the Brain.” **Pharmaceutical Research**. v. 28, p. 456-471, 2011.

SALGIN, S.; SALGIN, U.; BAHADIR, S.; “Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths.” **International Journal of Electrochemical Science**. v. 7, p. 12404-12414, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.” **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C.; **Análise de dados experimentais I. Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**. 1 ed., Rio de Janeiro, Brasil, e-papers, 2007.

SHASTRI, V. P.; “Non-Degradable Biocompatible Polymers in Medicine: Past, Present and Future.” **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, p. 331-337, 2003.

SMALE, S. T.; “Luciferase Assay – Protocol.” **Cold Spring Harb Protoc**, 2010.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; “Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I.” **Polímeros**, v. 22, p. 96-100, 2012a.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; “Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II”. **Polímeros**, v. 22, p. 101-106, 2012b.

TABORDA, C.; MEHNERT, D. U.; SILVA, C. A.; “Manual de Normas Técnicas.” **Biotério de Experimentação Animal**, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X.; “Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application.” **Progress in Polymer Science**. v. 37, p. 237-280, 2012.

TIAN, X.; WEI, F.; WANG, T., WANG, D.; WANG, J.; LIN, X.; WANG, P.; REN, L.; "Blood-brain barrier transport of Tat peptide and polyethylene glycol decorated gelatin-siloxane nanoparticle." **Materials Letters**. v. 68, p. 94-96, 2012.

THICKETT, S. C.; GILBERT, R. G.; "Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms." **Polymer**. v. 48, p. 6965-6991, 2007.

TIWARI, S. K.; AGARWAL, S.; SETH, B.; YADAV, A.; NAIR, S.; BHATNAGAR, P.; KARMAKAR, M.; KUMARI, M.; CHAUHAN, L. K. S.; PATEL, D. K.; SRIVASTAVA, V.; SINGH, D.; GUPTA, S. K.; TRIPATHI, A.; CHATURVEDI, R. K.; GUPTA, K. C.; "Curcumin-Loaded Nanoparticles Potently Induce Adult Neurogenesis and Reverse Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Model via Canonical Wnt/ β -Catenin Pathway ." **ACS Nano**. v. 8, p. 76-103, 2014.

TORCHILIN, V. P.; "Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers." **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p. 548-558, 2008.

TOSI, G., COSTANTINO, L.; RIVASI, F.; RUOZI, B.; LEO, E.; VERGONI, A. V.; TACCHI, R.; BERTOLINI, A.; VENDELLI, M. A.; FORNI, F.; "Targeting the central nervous system: In vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123." **Journal of Controlled Release**. v. 122, p. 1-9, 2007.

UHRICH, K. E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESHEFF, K. M.; "Polymeric Systems for Controlled Drug Release." **Chemical Reviews**. v. 99, p. 3181-3198, 1999.

VEGA-VILLA, K. R.; TAKEMOTO, J. K.; YÁNEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; FORREST, M. L.; DAVIES, N. M.; "Clinical toxicities of nanocarrier systems." **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, p. 929-938, 2008.

VIGO, M. S.; MALEC, L. S.; GOMEZ, R. G.; LLOSA, R. A.; "Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products." **Food Chemistry - Analytical Methods Section**. v. 44, p. 363-365, 1992.

VIGO, M. S.; MALEC, L. S.; GOMEZ, R. G.; LIOSA, R. A.; "Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products." **Food Chemistry**. v. 44, p. 363-365, 1992.

VOIGT, N.; HENRICH-NOACK, P.; KOCKENTIEDT, S.; HINTZ, W.; TOMAS, J.; SABEL, B. A.; "Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro." **Journal of nanoparticle research**. v. 16, p. 1-13, 2014.

WANG, N. X.; VON RECUM, H. A.; "Affinity-Based Drug Delivery." **Macromolecular Bioscience**. v. 11, p. 321-332, 2011.

WAY, D. V.; **Uso de *click chemistry* para bioconjugação de polímeros visando ao tratamento do câncer**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017. Tese.

WEISER, J; R.; SALTZMAN, W. M.; "Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models." **Journal of Controlled Release**. v. 190, p. 664-673, 2014.

WELSCH, N.; LU, Y.; DZUBIELLA, J.; BALLAUFF, M.; "Adsorption of proteins to functional polymeric nanoparticles." **Polymer**. v. 54, p. 2835-2849, 2013.

WILSON, B.; SAMANTA, M. K.; SANTHI, K.; KUMAR, K. P. S.; PARAMAKRISHNAN, N.; SURESH, B.; "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. 200, p. 159-168, 2008.

WILSON, B.; SAMANTA, M. K.; SANTHI, K.; KUMAR, S.; RAMASAMY, M.; SURESH, B.; "Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine." **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 6, p.144-152, 2010.

WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J.; "Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles." **Journal of Controlled Release**. v. 161, p. 264–273, 2012.

YUAN, L.; WANG, Y.; PAN, M.; REMPEL, G. L.; PAN, Q.; "Synthesis of poly(methyl methacrylate) nanoparticles via differential microemulsion polymerization." **European Polymer Journal**, v. 49, p. 41–48, 2013.

ZACAN, P.; SOLA-PENA, M.; FURTADO, C. M.; DA SILVA, D.; "Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells." **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 100, p. 372-378, 2010.

ZIEGLER, A.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; "Synthesis of phosphonate functionalized polystyrene and poly(methyl methacrylate) particles and their kinetic behavior in miniemulsion polymerization." **Colloid Polymer Science**. v. 287, p. 1261-1271, 2009.

ZOU, L.; MA, J.; WANG, T.; YANG, T.; LIU, C.; "Cell-Penetrating Peptide-Mediated Therapeutic Molecule Delivery into the Central Nervous System." **Current Neuropharmacology**. v. 11, p. 197-208, 2013.

APÊNDICE A

Concentração de surfactante e possibilidade de formação de micela

Os cálculos da concentração de surfactante livre e possível formação de micelas no meio reacional para cada uma das condições experimentais foram baseados em trabalhos de HECHT *et al.* (2011) e PEIXOTO (2013). De acordo com o equacionamento proposto:

$$M'_S = M_S^0 - M_S^{ad}$$

$$M_S^{ad} = \frac{A_{total}}{a_S} = \frac{6 \cdot M}{\rho \cdot d \cdot a_S}$$

$$a_S = \frac{6 \cdot \varphi}{X_{3,2} \cdot \rho_{MMA} \cdot C_S \cdot \kappa}$$

M'_S = Massa de surfactante disponível para formar micela (g);

M_S^0 = Massa de surfactante alimentada (g);

M_S^{ad} = Massa de surfactante adsorvido na interface (g);

A_{total} = área total das gotas de monômero (m²);

M = Massa de monômero alimentada (g);

a_S = Área ocupada pelo surfactante - eficiência de cobertura (m²/g);

φ = fração da fase orgânica;

$X_{3,2}$ = diâmetro de Sauter - diâmetro da partícula (m);

C_S = concentração de surfactante em massa do total (g/mL);

κ = fator de correlação que leva em conta a concentração dissolvida no meio contínuo

- Considerações:

$$\rho_{MMA} = 0,94 \text{ g/mL}$$

$$X_{3,2} = \text{diâmetro da partícula (m)}$$

$$\kappa = 0,8 \text{ (HECHT et al., 2011)}$$

$$\text{CMC}_{\text{SDS}} = 2,31 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$$

$$\text{CMC}_{\text{CTAB}} = 3,65 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$$

APÊNDICE A – Concentração de surfactante e possibilidade de formação de micela

Caso a concentração de surfactante livre no meio for maior que a CMC do surfactante, existe a possibilidade de formação de micelas. Os resultados dos cálculos para as condições de testes apresentados na Seção 4.1 deste documento são mostrados na Tabela A.1.

Tabela A.1: Avaliação da possibilidade de formação de micela para as condições de teste.

Teste	Massa de surfactante disponível (M'_S) (g)	Concentração de surfactante livre (C'_S) (g/mL)	Pode formar micela?
1	$1,92 \times 10^{-2}$	$3,00 \times 10^{-4}$	Não
2	$3,20 \times 10^{-2}$	$5,00 \times 10^{-4}$	Não
3	$9,60 \times 10^{-2}$	$1,50 \times 10^{-3}$	Não
4	$1,60 \times 10^{-1}$	$2,50 \times 10^{-3}$	Sim
5	$1,92 \times 10^{-2}$	$3,00 \times 10^{-4}$	Não
6	$3,20 \times 10^{-2}$	$5,00 \times 10^{-4}$	Sim
7	$9,60 \times 10^{-2}$	$1,50 \times 10^{-3}$	Sim
8	$1,60 \times 10^{-1}$	$2,50 \times 10^{-3}$	Sim
9, 10, 11	$9,60 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^{-4}$	Não
12, 13, 14	$9,60 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^{-4}$	Sim

C'_S é a concentração de surfactante livre na fase aquosa.

APÊNDICE B

Dosagem de proteínas e peptídeos

- Método de Bradford

Para o preparo do reagente de BRADFORD, dissolveram-se 0,05 g do corante azul brilhante de cromassie em 25 mL de etanol 95%. Este sistema foi mantido sob agitação magnética por 20 min. Logo depois, 50 mL de ácido ortofosfórico 85% foi adicionado ao meio, deixando-se sob agitação magnética por mais 2 horas. O sistema foi montado em vidro âmbar coberto com papel alumínio. A solução final obtida foi transferida para um balão de 500 mL, tendo o volume completado com água Milli-Q. O reagente foi acondicionado em vidro âmbar e mantido sob refrigeração, sendo que antes de cada análise o reagente foi previamente filtrá-lo.

A curva de calibração para o ensaio de BRADFORD foi montada a partir de uma solução padrão de proteína BSA em água na concentração de 0,1 g/L. A partir desta solução padrão, realizaram-se sucessivas diluições, de forma a obter uma variação de concentração de 0,01 a 0,1 g/L, como mostrado na Tabela B.1. A leitura das concentrações foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 595 nm.

Tabela B.1: Sequência de diluição para montagem da curva de calibração.

Tubo	Conc. (g/L)	Vol. padrão (mL)	Vol. H ₂ O (mL)
1	0,1	1	-
2	0,08	1	0,25
3	0,06	1	0,6
4	0,04	1	1,5
5	0,02	1	4
6	0,01	1	9

Para cada análise, adicionou-se 1 mL do Reagente de BRADFORD e 0,1 mL de amostra em cada tubo eppendorf. As amostras foram incubadas por 10 min para posterior leitura da absorbância.

A cada nova rotina de análise, foi construída uma nova curva de calibração, pois o reagente sofre ação de envelhecimento.

- Reagente o-ftaldialdeído (OPA)

Utilizou-se uma solução comercial do reagente o-ftaldialdeído para quantificação do aminoácido lisina. A detecção foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 340 nm.

A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão da lisina em tampão tetraborato pH = 9,7, na concentração de 0,5 g/L, de acordo com a seguinte sequência de diluições, de acordo com a Tabela B.2.

Tabela B.2: Sequência de diluição para montagem da curva de calibração.

Tubo	Conc. (g/L)	Vol. padrão (mL)	Vol. H₂O (mL)
1	0,5	1	-
2	0,4	1	0,25
3	0,3	1	0,6
4	0,2	1	1,5
5	0,1	1	4
6	0,05	1	9

Para cada análise, adicionaram-se 200 µL do reagente OPA e 5 µL de amostra em placa de poços para leitura. As amostras foram incubadas por 2 min para posterior leitura da absorbância.

APÊNDICE C

Distribuições de tamanhos de partícula

Apresentam-se a seguir as distribuições de tamanho de gota e partícula obtidas para os materiais produzidos pelas reações descritas no planejamento experimental.

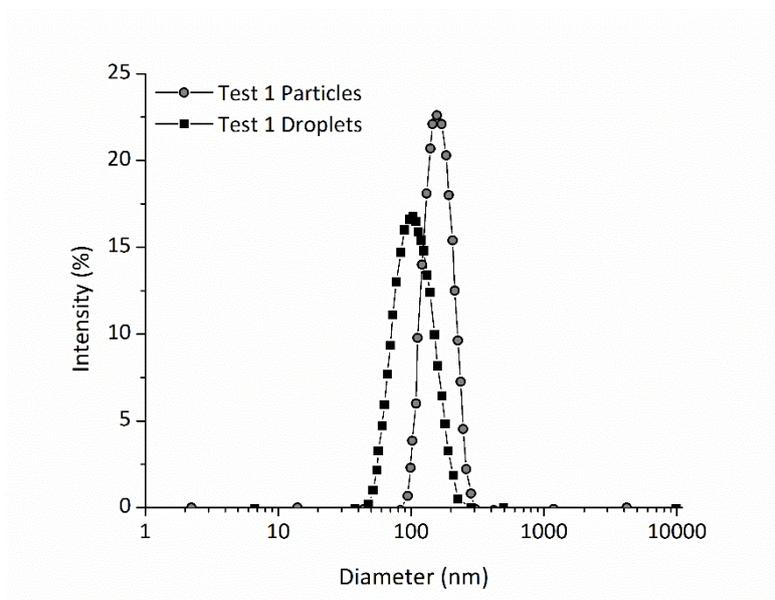


Figura C.1: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 1).

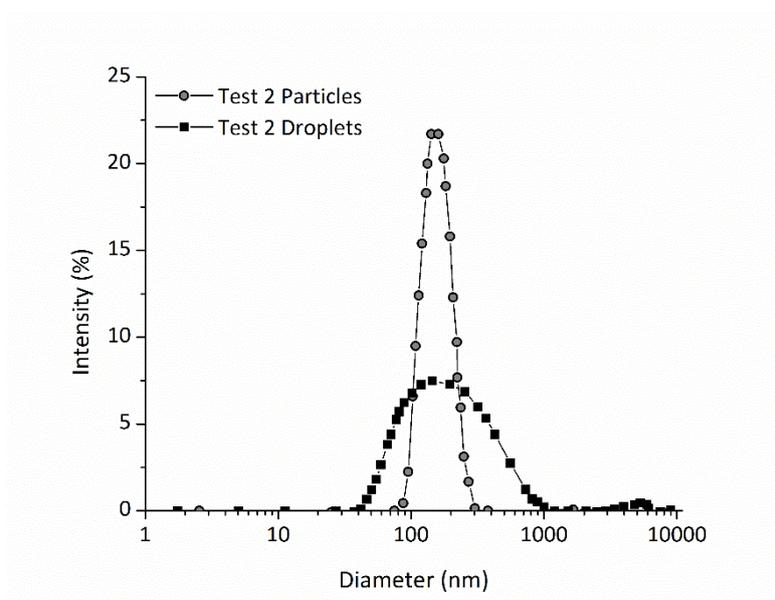


Figura C.2: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 2).

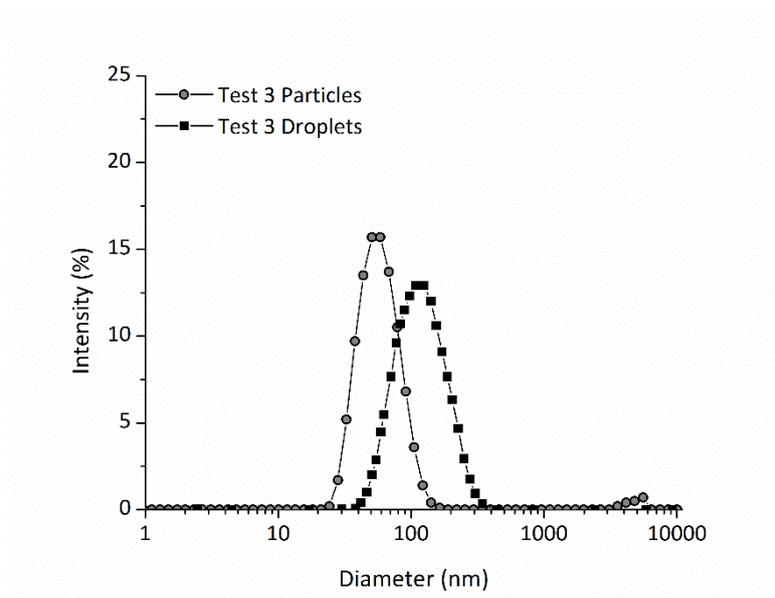


Figura C.3: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 3).

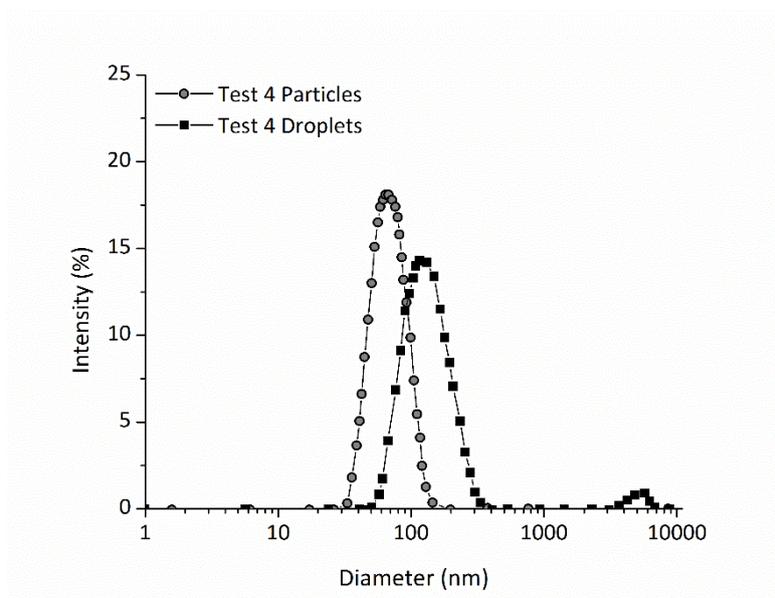


Figura C.4: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 4).

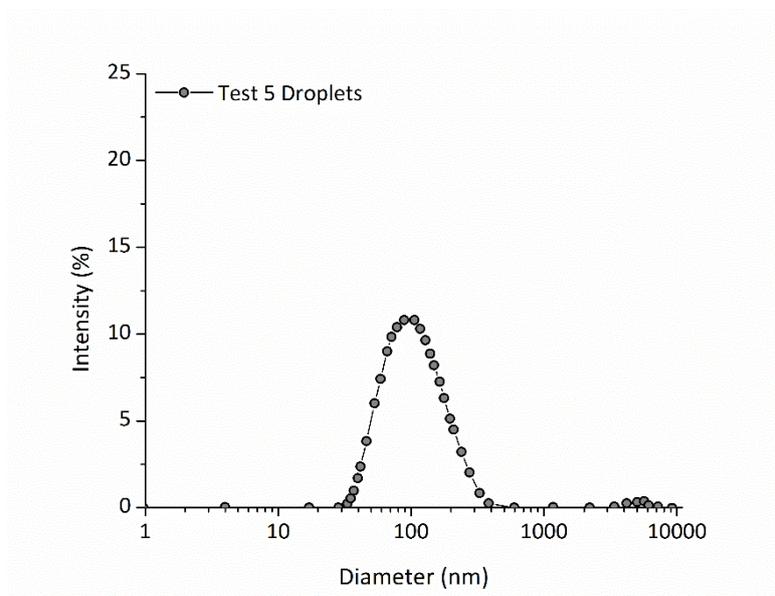


Figura C.5: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 5).

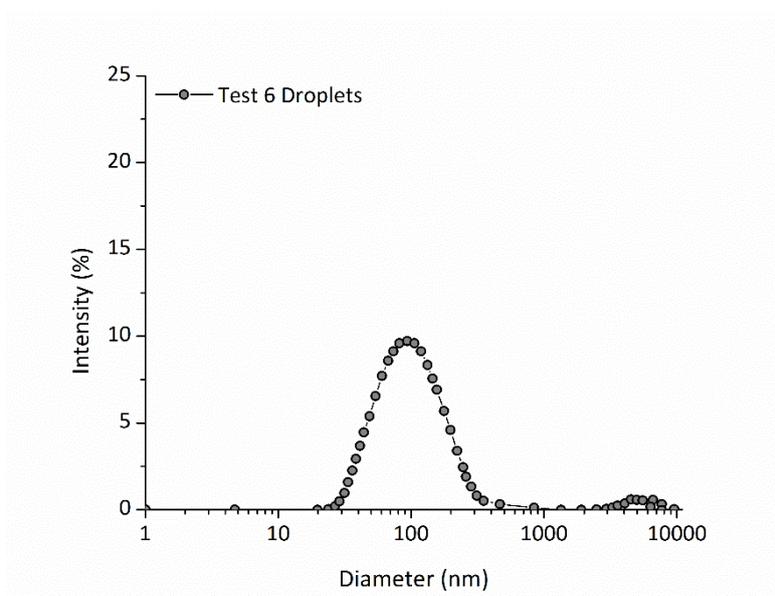


Figura C.6: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 6).

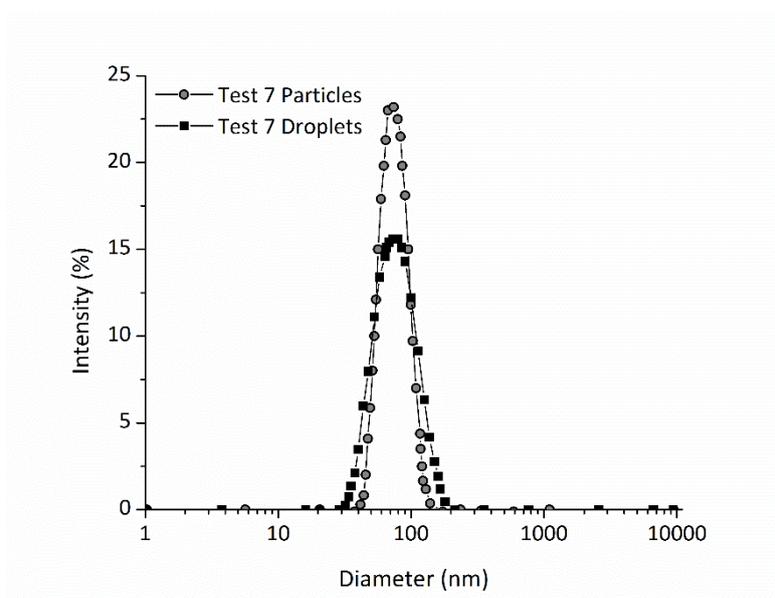


Figura C.7: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 7).

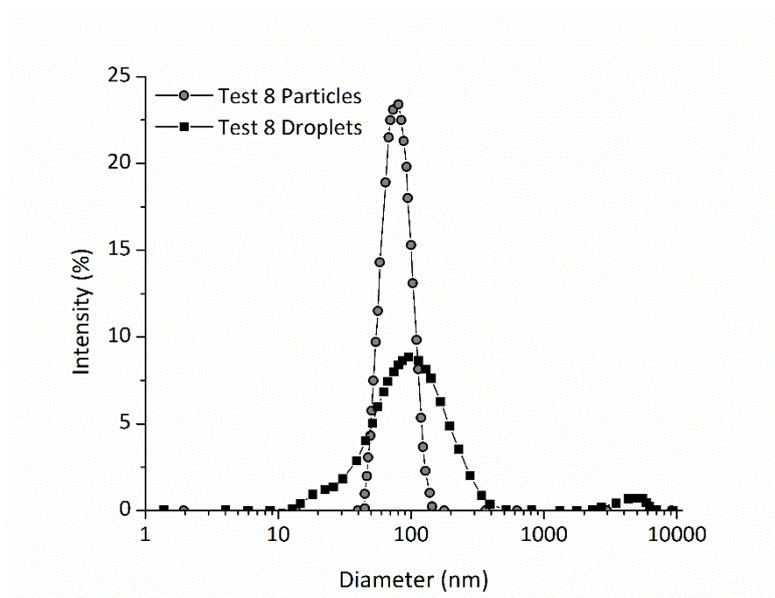


Figura C.8: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 8).

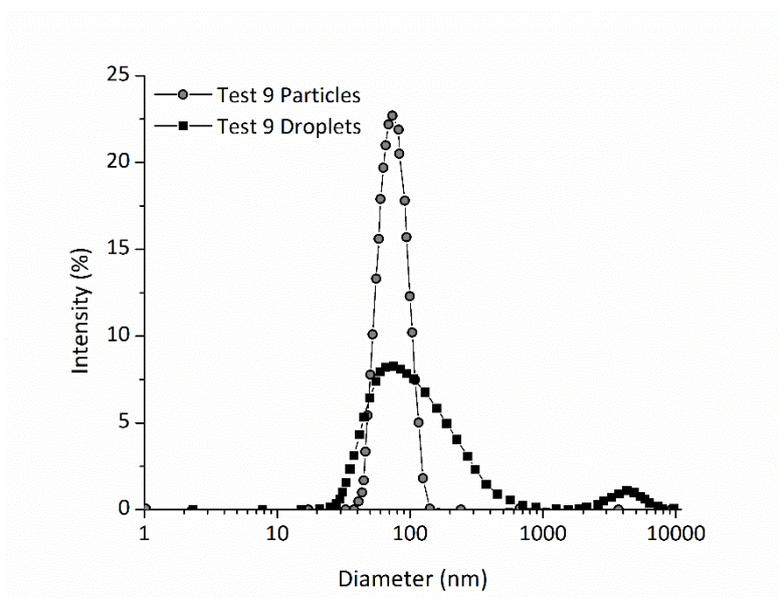


Figura C.9: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 9).

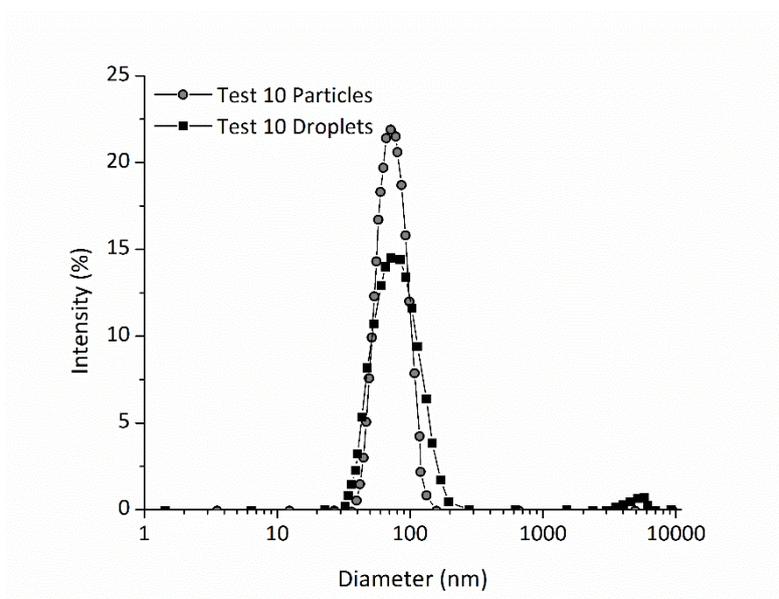


Figura C.10: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 10).

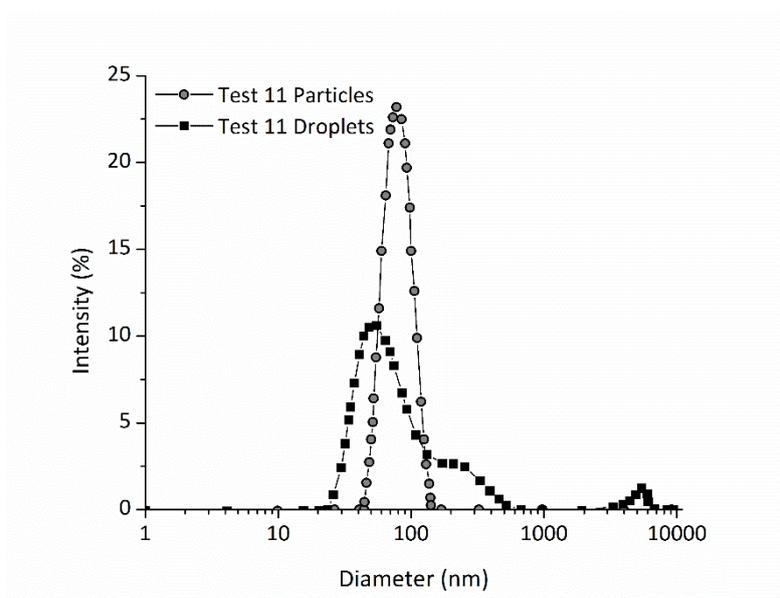


Figura C.11: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 11).

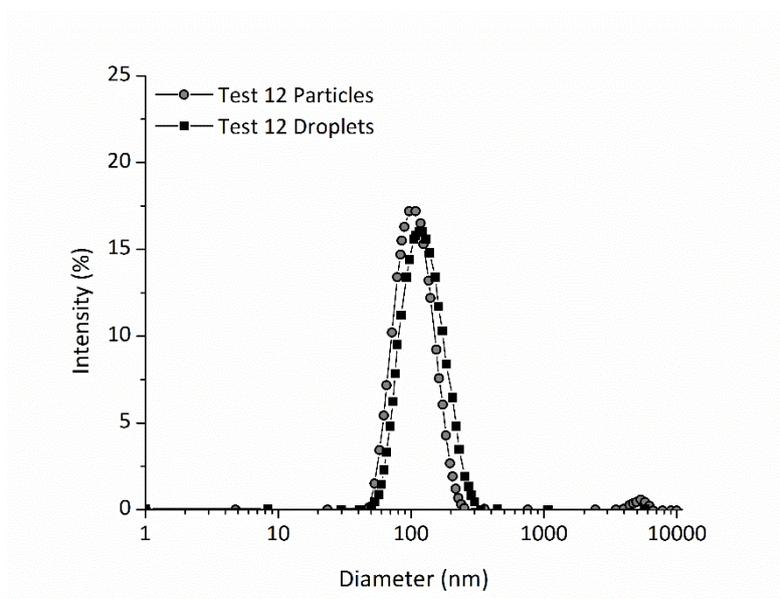


Figura C.12: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 12).

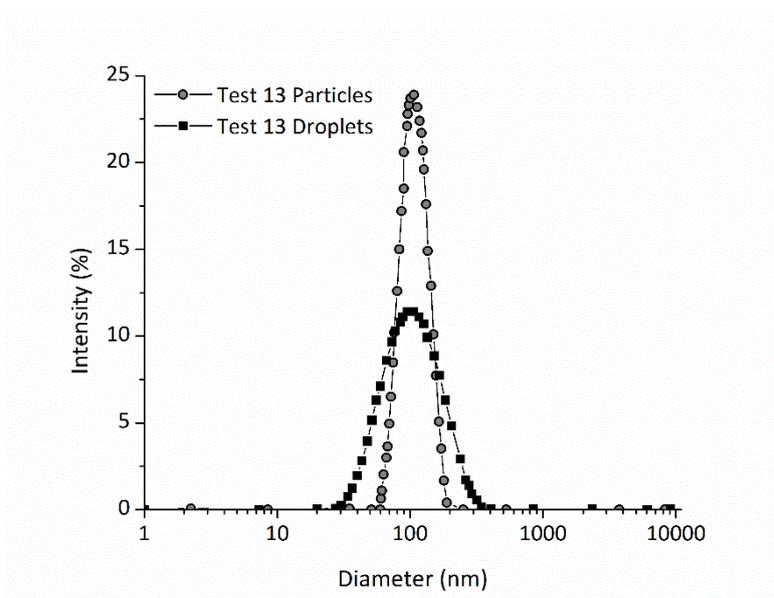


Figura C.13: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 13).

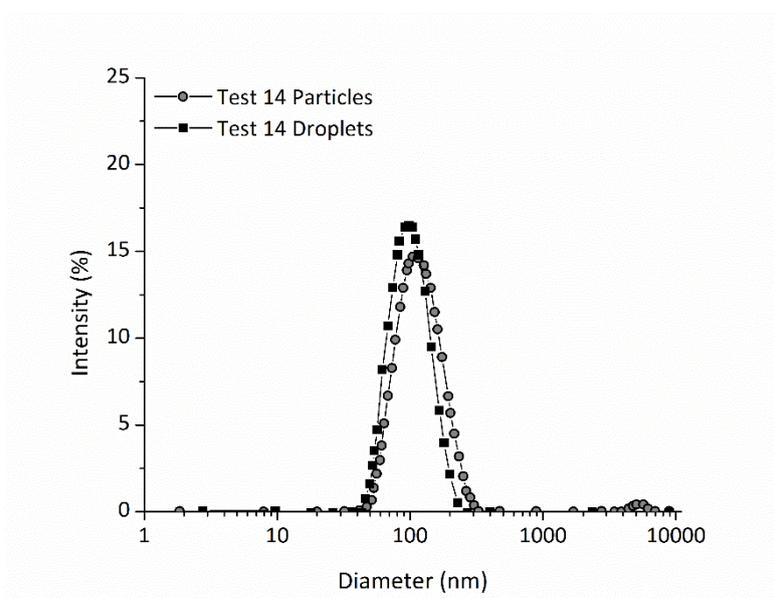


Figura C.14: Distribuição de tamanho (Condição experimental Teste 14).

É importante notar que, em geral, as distribuições de tamanho das gotas foram mais dispersas (distribuições mais largas) do que as distribuições de tamanho das partículas, como ilustrado nas Figuras C.1-C.14, indicando a ocorrência dos efeitos de transferência de massa durante a reação, possivelmente devido à grande variedade de análises concentrações de surfactantes. No entanto, deve-se enfatizar que as técnicas utilizadas para caracterizar as gotas e as partículas são invasivas, requerendo amostragem e diluição da amostra, que também pode alterar o equilíbrio sensível da miniemulsão.

O homopolímero PMMA (R01), produzido com surfactante SDS na concentração de 1% (m/m), em relação ao monômero, apresentou distribuição de tamanhos de partícula uniforme durante todo o progresso da reação, conforme mostrado na Figura C.15. Este comportamento caracteriza a não ocorrência de nucleação micelar, de maneira que o sistema comporta como uma miniemulsão típica.

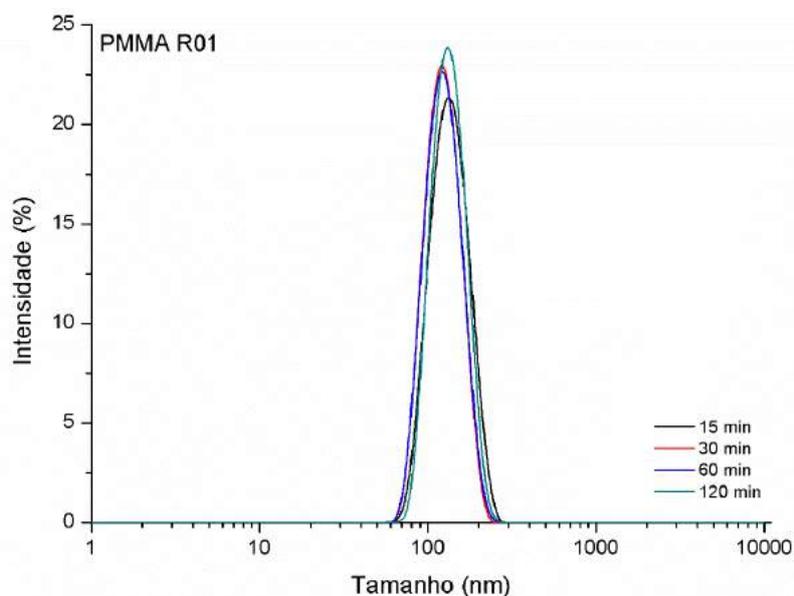


Figura C.15: Distribuições de tamanhos de partícula para PMMA (R01), durante a reação.

Para os copolímeros de P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-AA) CQ, observa-se um deslocamento das distribuições de tamanho a partir do tempo 20 min, mostrado nas Figuras C.16 e C.17. Este deslocamento para tamanhos maiores pode estar relacionado a aglomeração de partículas já formadas. O ácido acrílico apresenta uma tendência de permanecer na superfície das partículas, visto sua alta solubilidade em água. A partícula final produzida apresentou diâmetro médio de 100 nm.

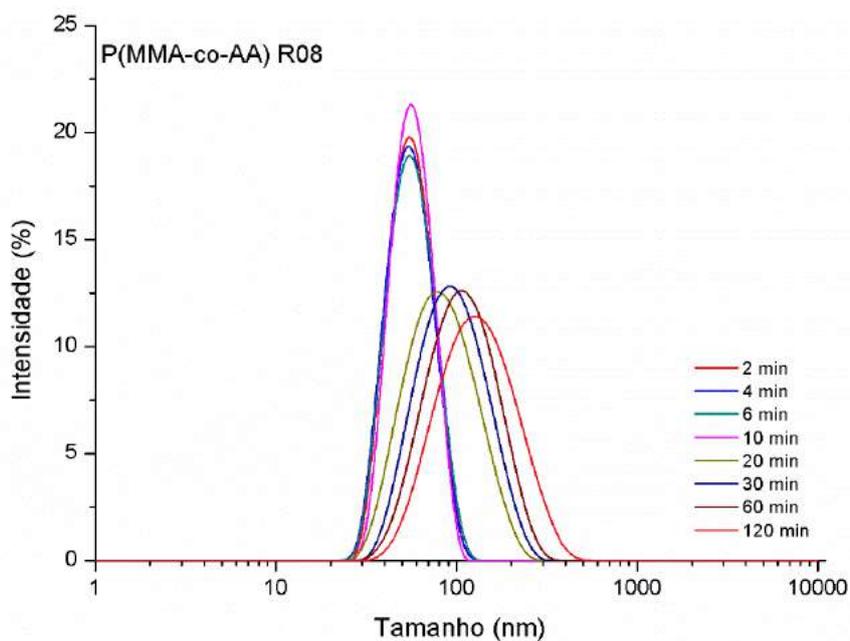


Figura C.16: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) (R08), durante a reação.

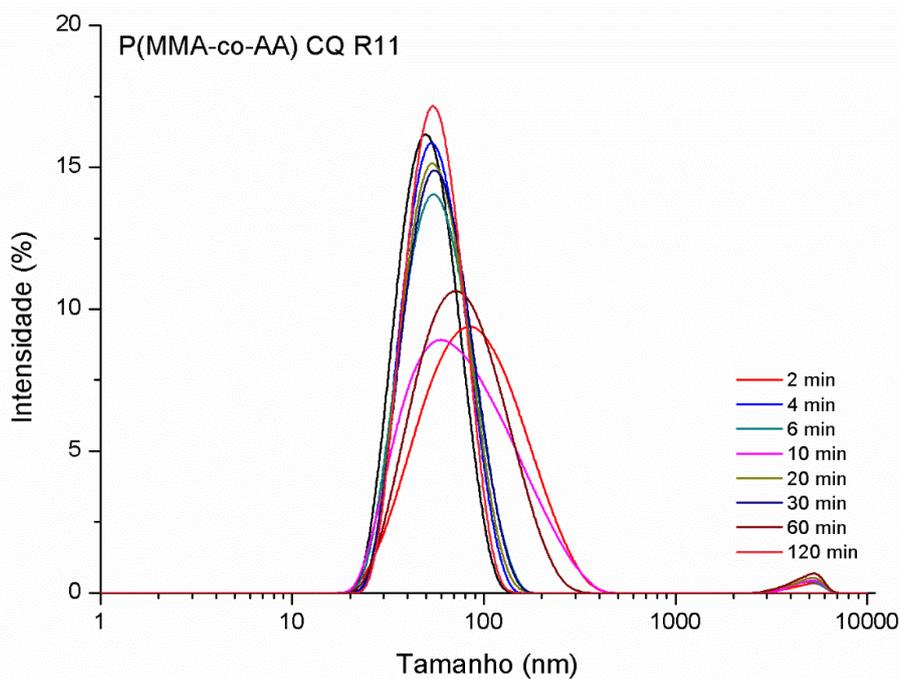


Figura C.17: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) CQ (R011), durante a reação.

No copolímero produzido com MAA as distribuições de tamanhos de partícula se mantiveram semelhantes durante a reação, como mostrado na Figura C.18 a C-20, caracterizando novamente o comportamento de miniemulsão.

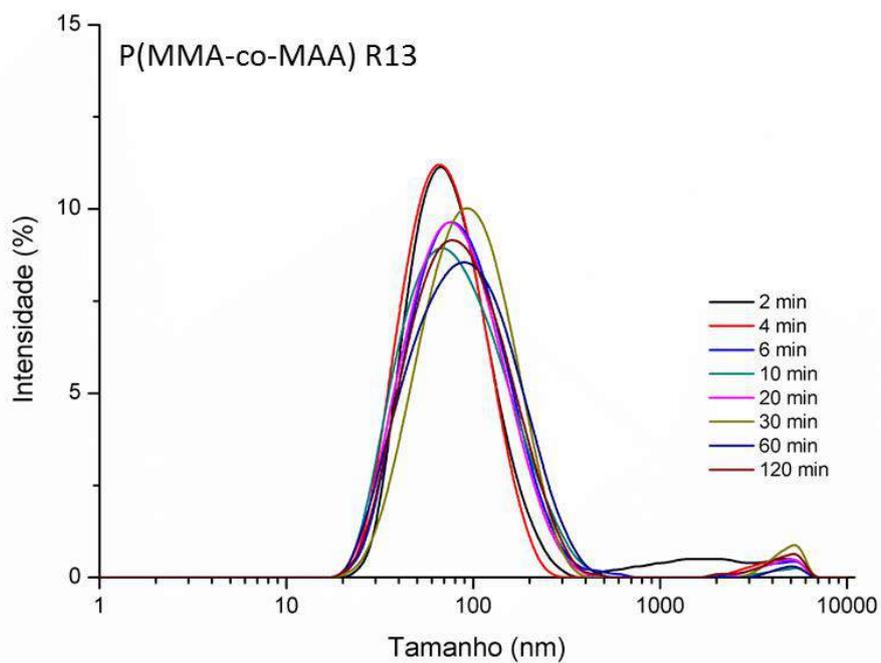


Figura C.18: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-MAA) (R013), durante a reação.

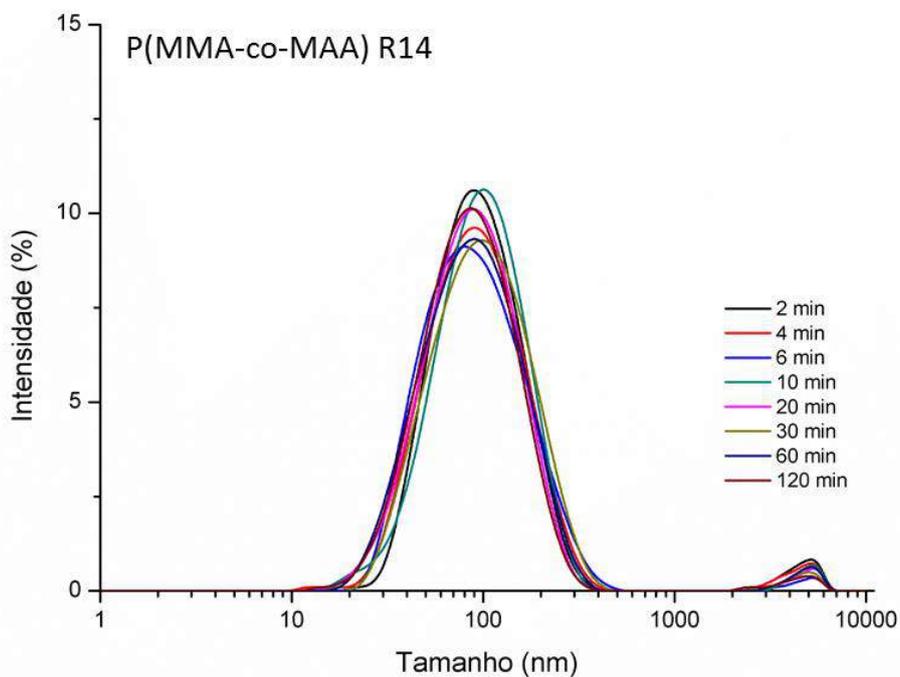


Figura C.19: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-MAA) (R014), durante a reação.

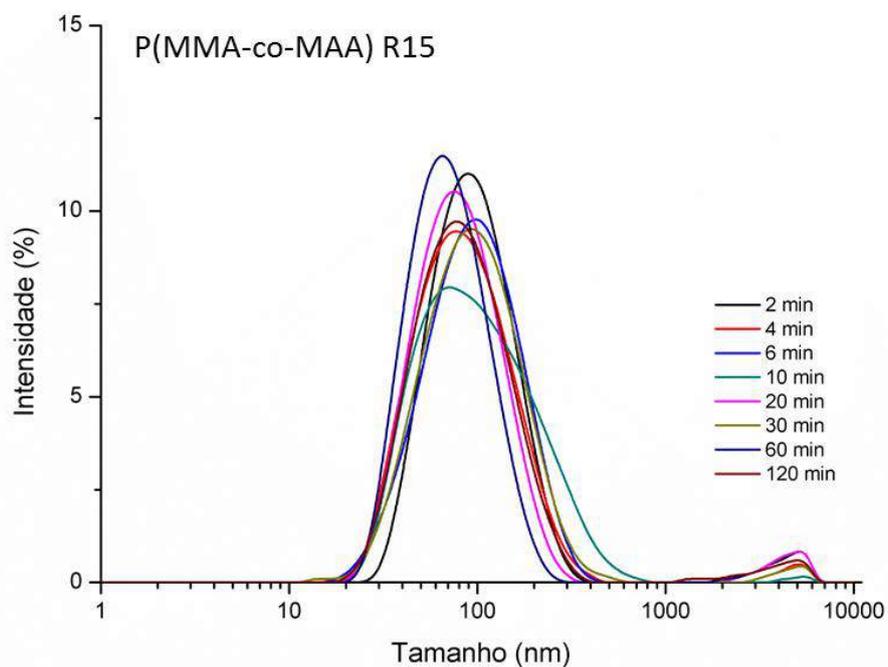


Figura C.20: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-MAA) (R015), durante a reação.

Nas figuras seguintes são apresentadas comparações entre as distribuições de tamanho de partícula para diferentes iniciadores, concentração de surfactante e proporção de AA inserido no meio reacional.

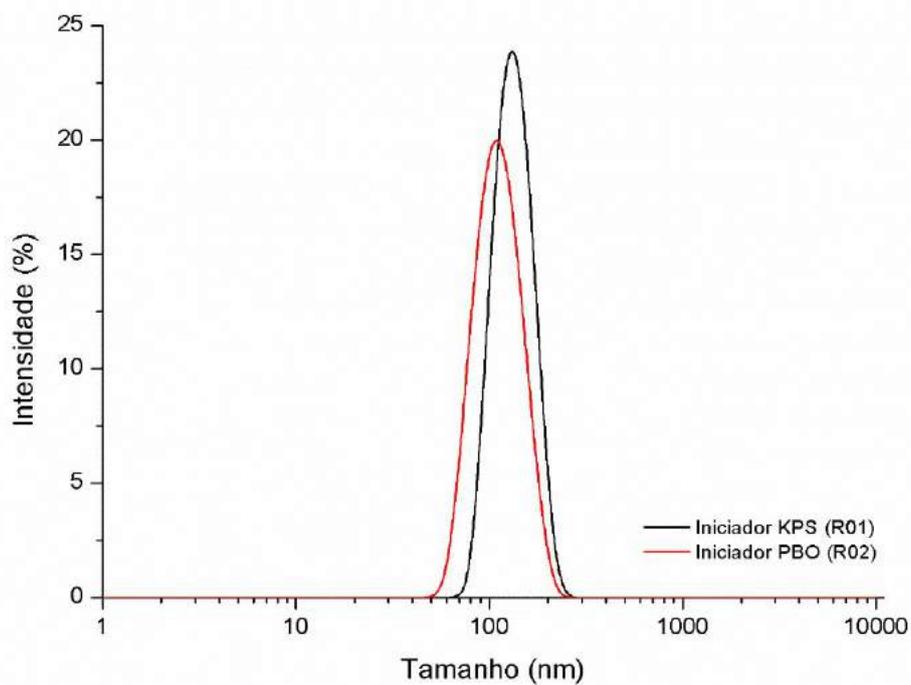


Figura C.21: Distribuições de tamanhos de partícula para PMMA (R01 e R02).

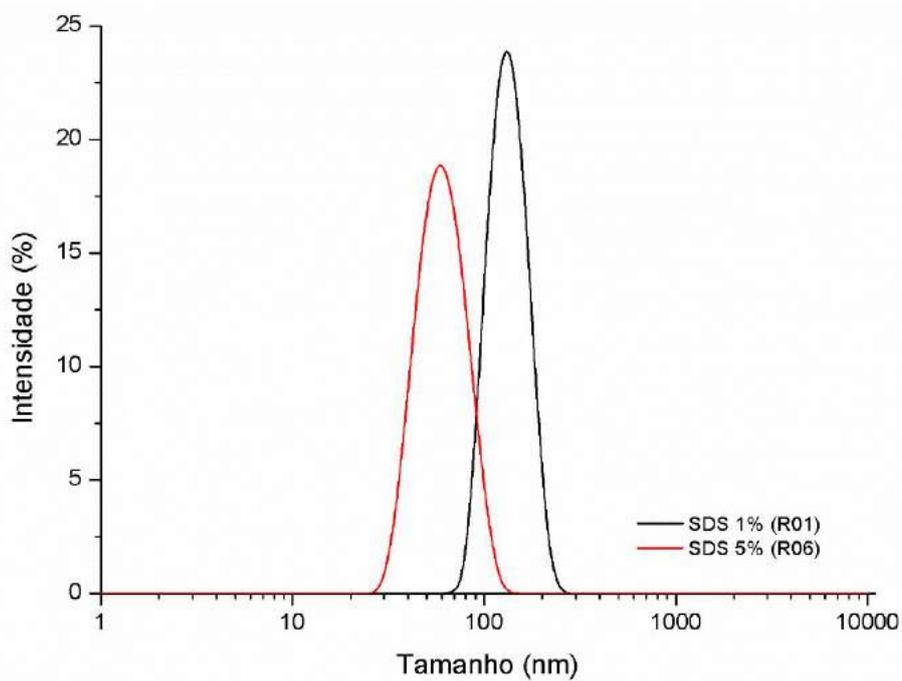


Figura C.22: Distribuições de tamanhos de partícula para PMMA (R01 e R06).

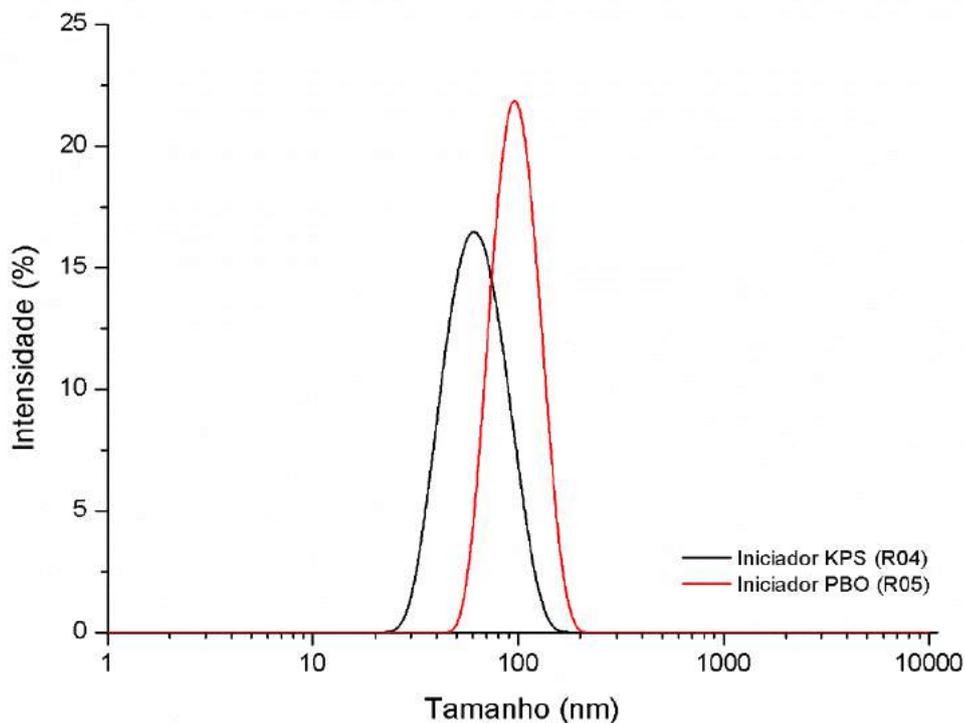


Figura C.23: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) (R04 e R05).

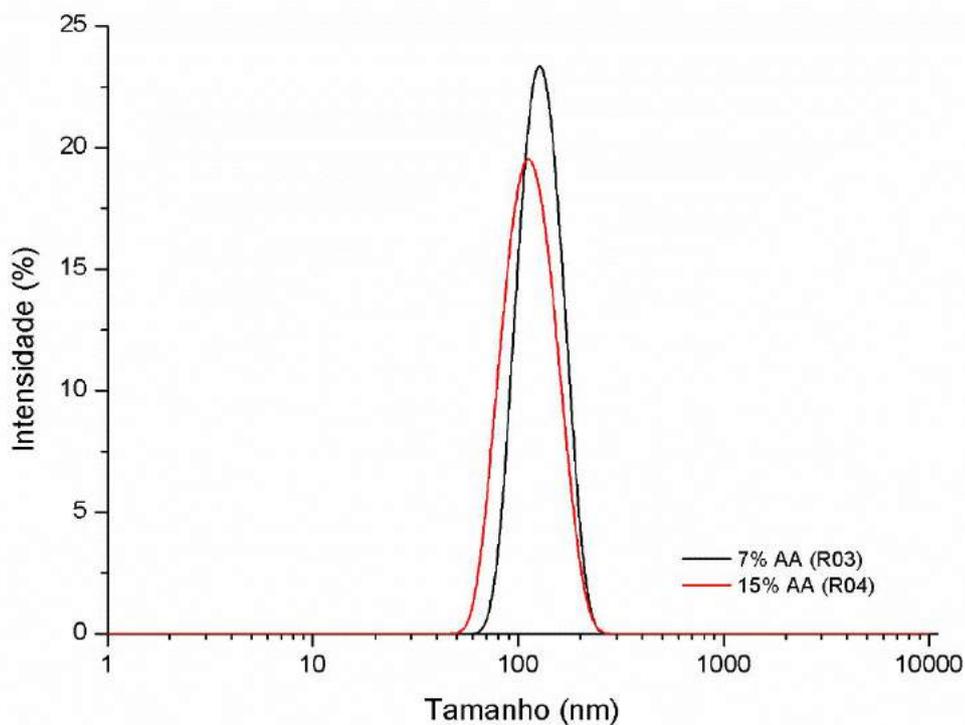


Figura C.24: Distribuições de tamanhos de partícula para P(MMA-co-AA) (R03 e R04).

APÊNDICE D

Modelos: Estimação de Parâmetros

Com o objetivo de estudar o efeito das variáveis, tipo de agente surfactante, concentração e razão O/A, buscou-se um modelo empírico linear nos parâmetros para adequação dos resultados experimentais.

Como o planejamento experimental foi baseado em repetições apenas dos pontos centrais, os erros foram avaliados somente nestes pontos e expandidos para os demais, sendo considerado constante. Supondo-se que os erros obtidos estão normalmente distribuídos e admitindo-se um intervalo de confiança de 95%, a avaliação da flutuação do sistema deu-se por meio dos testes estatísticos t-Student, Chi-quadrado e teste F.

A função objetivo dos mínimos quadrados, mostrada na Equação D.1, foi utilizada para concepção do modelo.

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{NE} (y_i^E - y_i^C)^2 \quad (D.1)$$

Em que NE é o número de experimentos realizados, y_i^E o valor da medida experimental na condição i , e y_i^C é o valor da medida calculada pelo modelo na condição i . A definição do modelo se deu a partir de tentativas, partindo-se de uma expressão mais completa, que levou em conta os efeitos principais e efeitos de sinergia entre as variáveis estudadas, como mostrado na Equação D.2.

$$y^c = a_0 + \sum_{i=1}^{NX} a_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^{NX-1} \cdot \sum_{j=i+1}^{NX} b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (D.2)$$

Em que a_i e b_{ij} são os parâmetros do modelo e x_i são as variáveis independentes do sistema.

O modelo proposto foi avaliado em relação ao valor mínimo da função objetivo, devendo este estar dentro do intervalo de confiança definido pela distribuição Chi-quadrado; pela comparação das variâncias amostral do experimento e de predição do modelo, a partir do teste F; e pelo coeficiente de correlação entre os valores experimentais e o modelo, sendo admitidos satisfatório valores maiores que 0,9. A matriz de covariância dos parâmetros foi utilizada para avaliar a qualidade dos parâmetros obtidos e intervalo de confiança dos parâmetros foi definido pelo teste t-Student.

Modelo para diâmetro de partícula

$$dp = (91 \pm 2) + (18 \pm 2) \cdot x_1 - (57 \pm 4) \cdot x_2 - (11 \pm 4) \cdot x_1 \cdot x_2 + (4 \pm 2) \cdot x_2 \cdot x_3 + (33 \pm 4) \cdot x_2^2$$

(D.3)

Teste valor final da função objetivo: $1,24 < F_{obj} = 4,86 < 14,45$

Comparação das variâncias: $\frac{s_{modelo}^2}{s_{exp}^2} = 0,09 < 0,14$ – o modelo não representa os dados experimentais com sua precisão.

Coeficiente de correlação: $R=0,998$

Tabela D.1: Matriz de correlação dos parâmetros mostrados na Equação D.3.

Matriz de correlação

	a0	a1	a2	a12	a23	b1
a0	1,000000	0,156200	-0,098789	-0,098789	0,000000	-0,491005
a1	0,156200	1,000000	-0,632456	-0,632456	0,000000	0,491005
a2	-0,098789	-0,632456	1,000000	0,746860	0,000000	-0,543443
a12	-0,098789	-0,632456	0,746860	1,000000	0,000000	-0,543443
a23	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
b1	-0,491005	0,491005	-0,543443	-0,543443	0,000000	1,000000

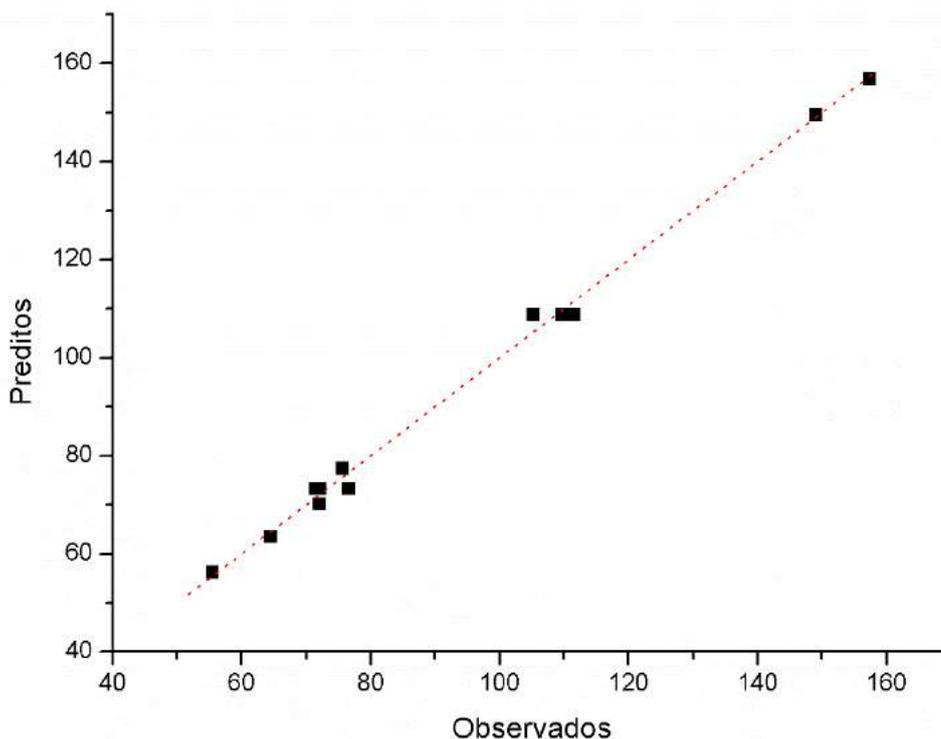


Figura D.1: Ajuste do modelo para o diâmetro de partículas

Modelo para potencial zeta

$$zeta = -(5 \pm 2) + (45 \pm 2) \cdot x_1 - (4 \pm 4) \cdot x_1 \cdot (x_2^2 - \frac{8}{14}) \quad (D.4)$$

Teste valor final da função objetivo: $2,7 < F_{obj} = 17,42 < 19,02$

Comparação das variâncias: $0,17 < \frac{s_{modelo}^2}{s_{exp}^2} = 0,22 < 39,39$

Coefficiente de correlação: $R=0,997$

Tabela D.2: Matriz de correlação dos parâmetros mostrados na Equação D.4.

Matriz de correlação

	a0	a1	b1
a0	1,000000	-0,375719	0,157088
a1	-0,375719	1,000000	0,157088
b1	0,157088	0,157088	1,000000

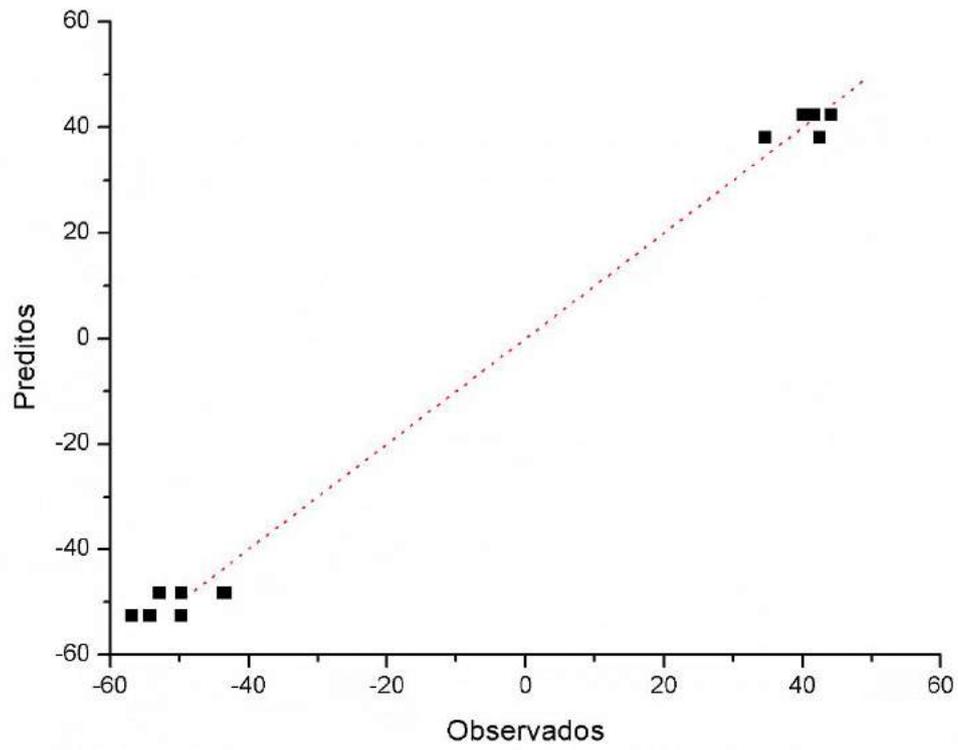


Figura D.2: Ajuste do modelo para o potencial zeta.

APÊNDICE E

Curvas de distribuição de massas molares

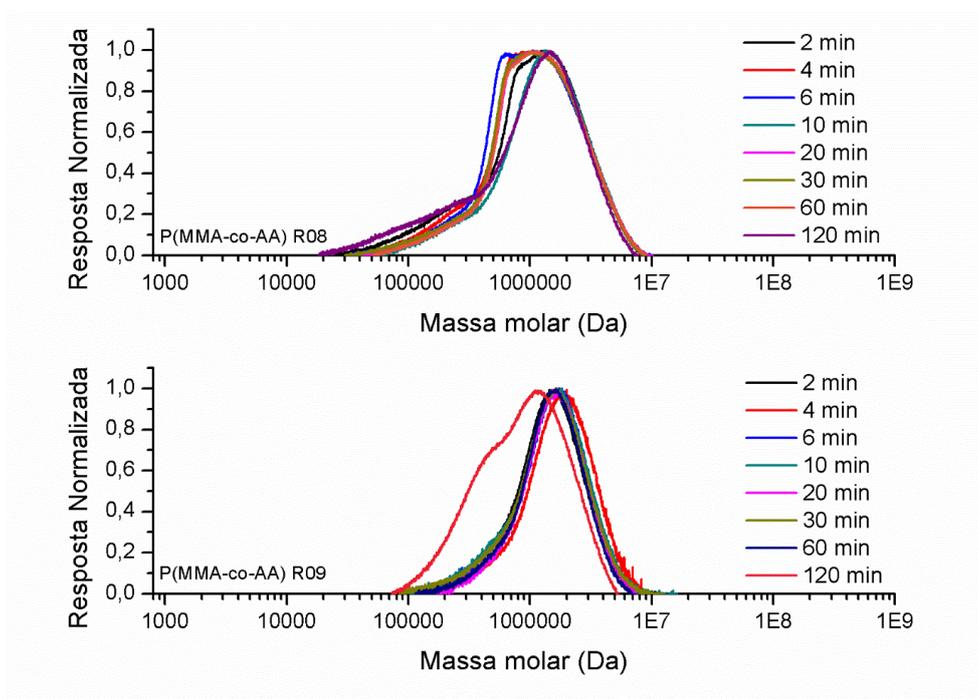


Figura E.1: Curvas de distribuição de massas molares para P(MMA-co-AA) – reações R08 E R09.

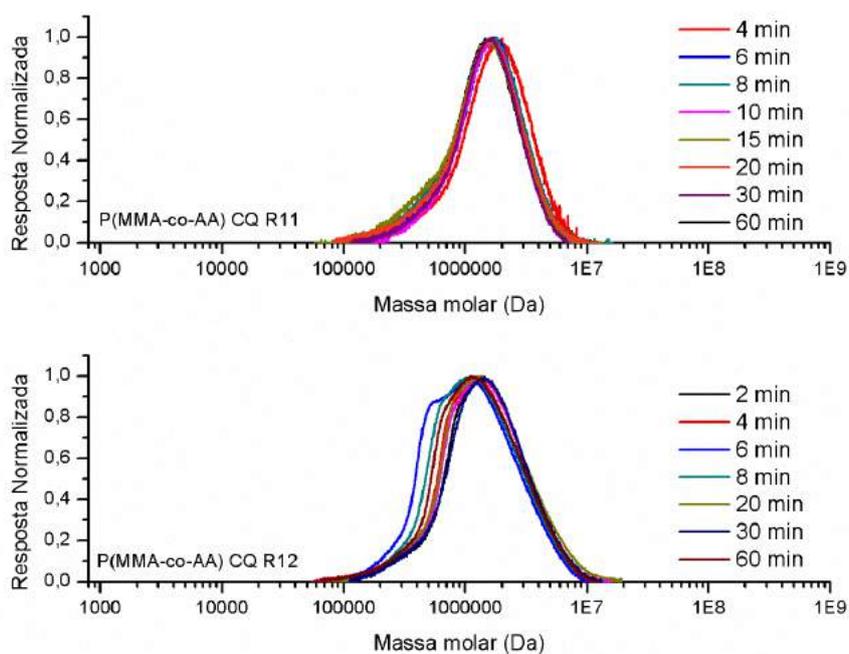


Figura E.2: Curvas de distribuição de massas molares para P(MMA-co-AA) dopado com cloquinol – reações R11 e R12.

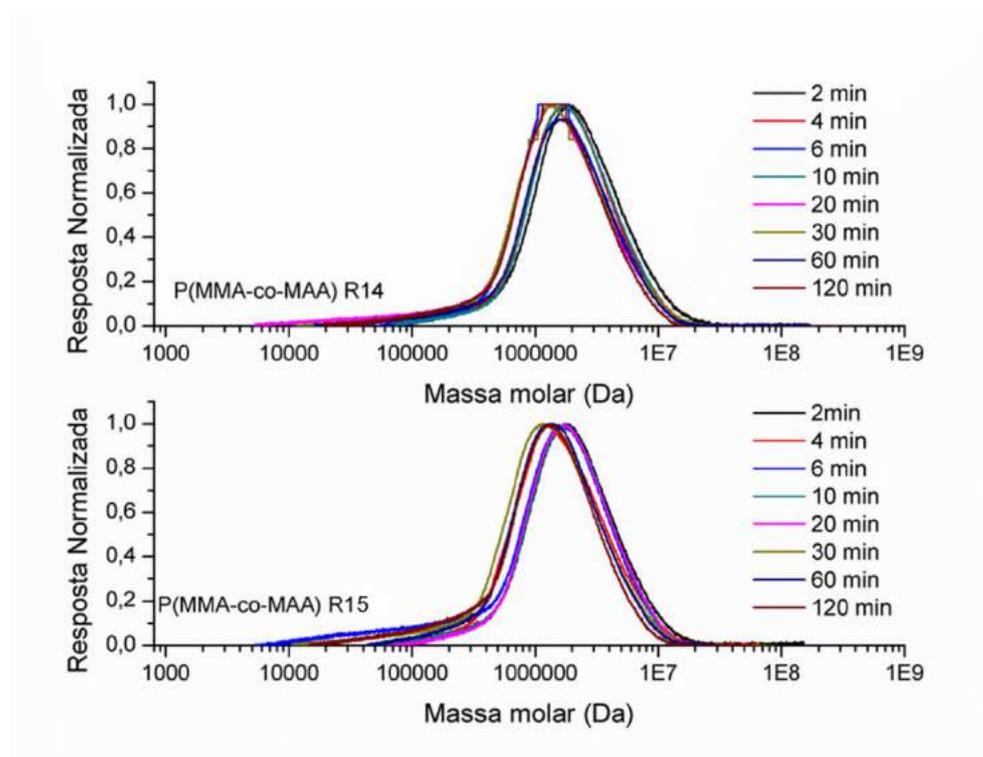


Figura E.3: Curvas de distribuição de massas molares para P(MMA-co-MAA) – reações R14 e R15.

As figuras a seguir apresentam as distribuições de massas molares para os polímeros com clioquinol produzidos por polimerização em massa, utilizando os iniciadores PBO e AIBN. As curvas mostram a maior sensibilidade da reação quando na presença de PBO, visto que os gráficos mostram curvas com massas molares distintas. Este comportamento é observado principalmente quando baixas concentrações do iniciador são utilizadas. Já as amostras produzidas com AIBN mostram curvas semelhantes, de maneira que o clioquinol não afeta apreciavelmente a cinética da reação.

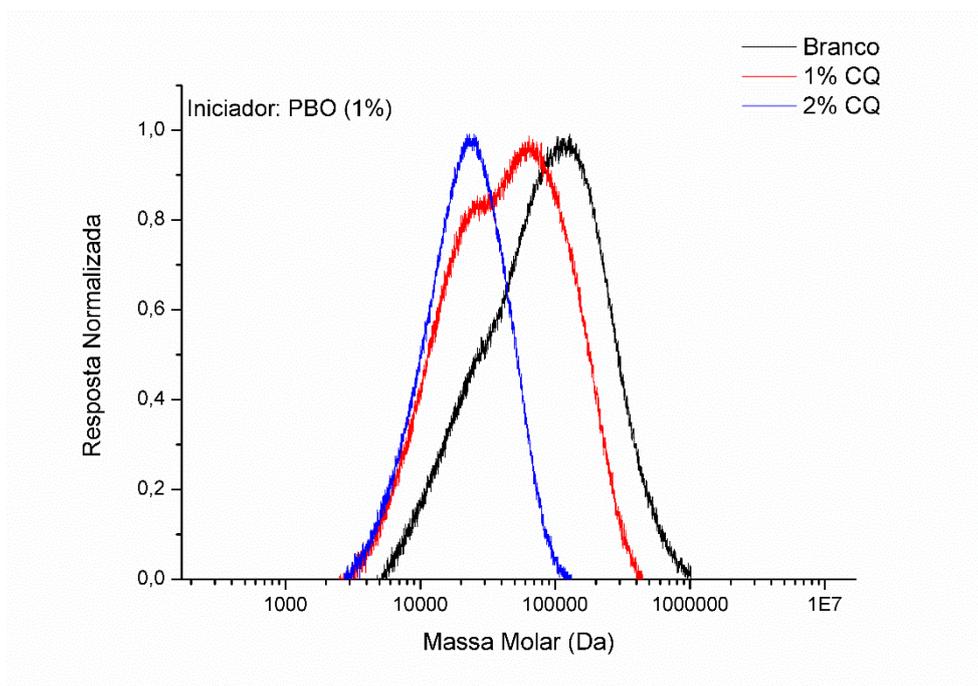


Figura E.4: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador PBO a 1 % (m/m).

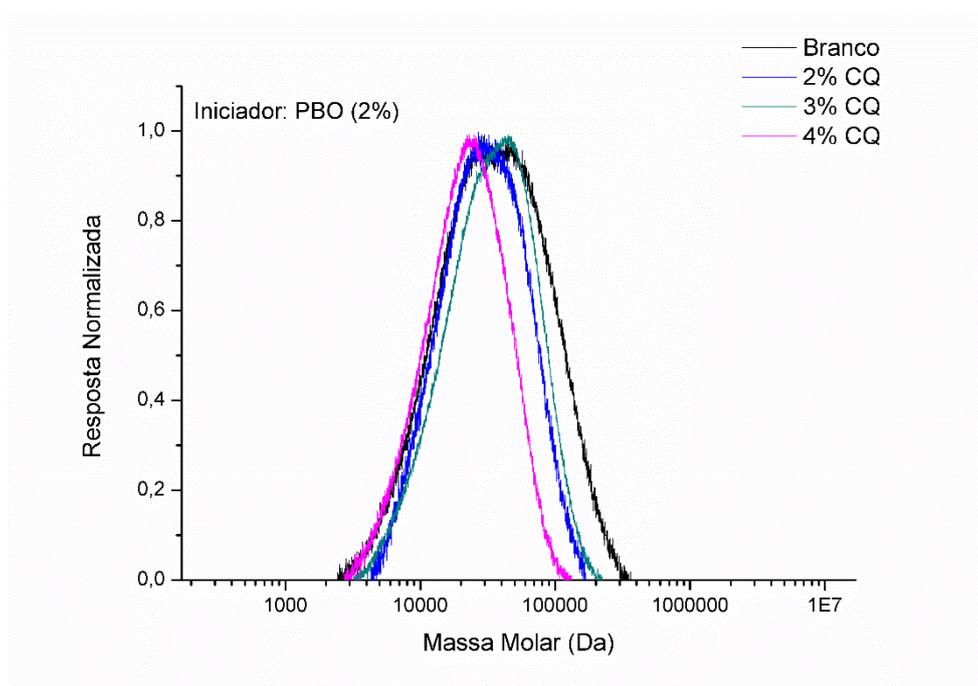


Figura E.5: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador PBO a 2 % (m/m).

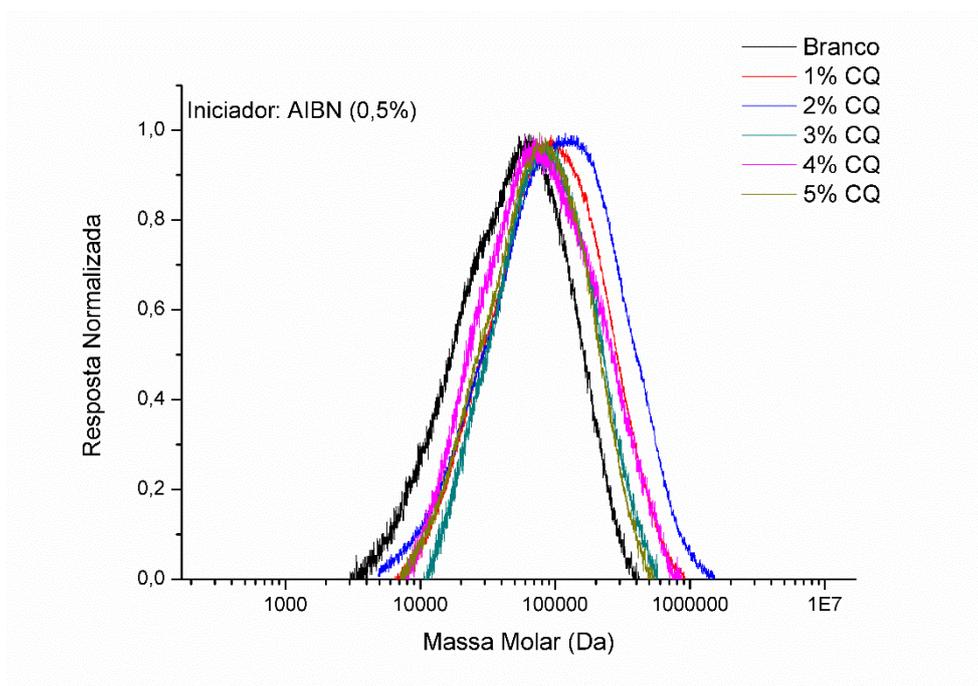


Figura E.6: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador AIBN a 0,5 % (m/m).

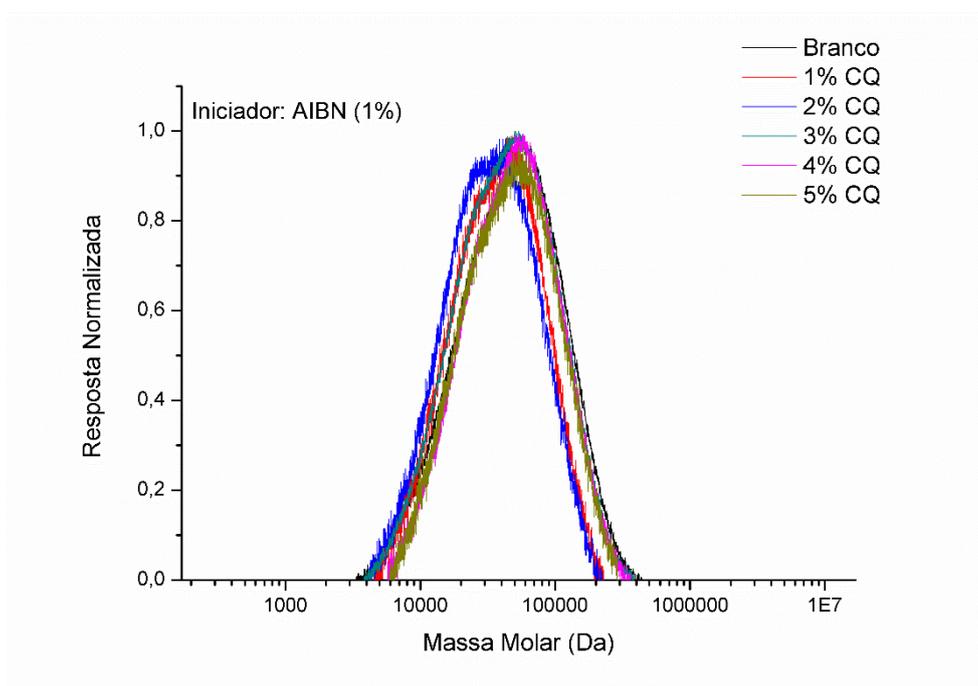


Figura E.7: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador AIBN a 1 % (m/m).

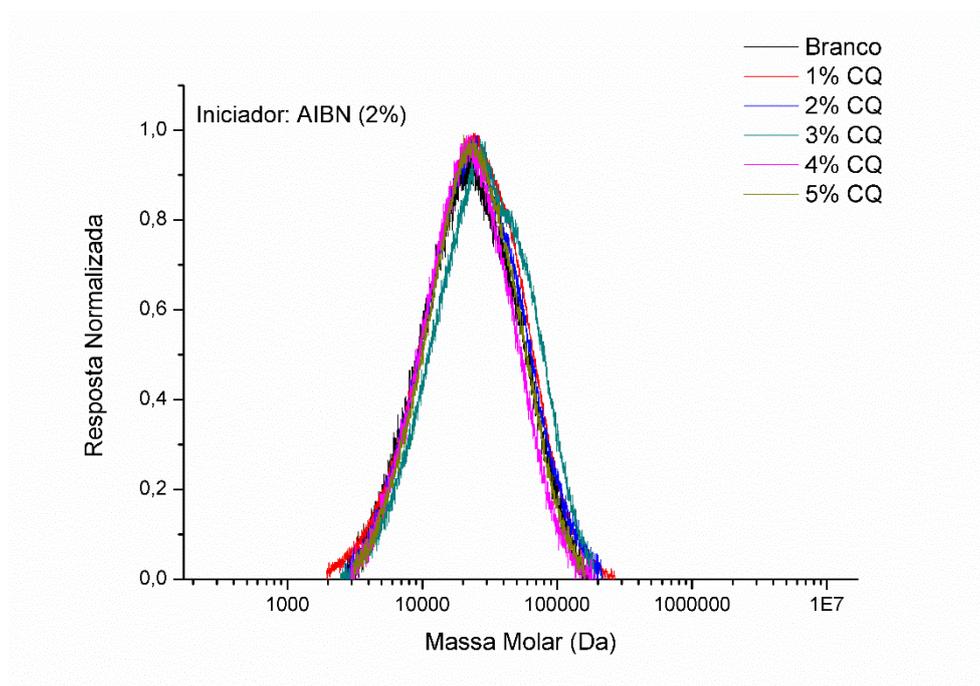


Figura E.8: Curvas de distribuição de massas molares para amostras produzidas por polimerização em massa com iniciador PBO a 2 % (m/m).

APÊNDICE F

Termogramas de DSC

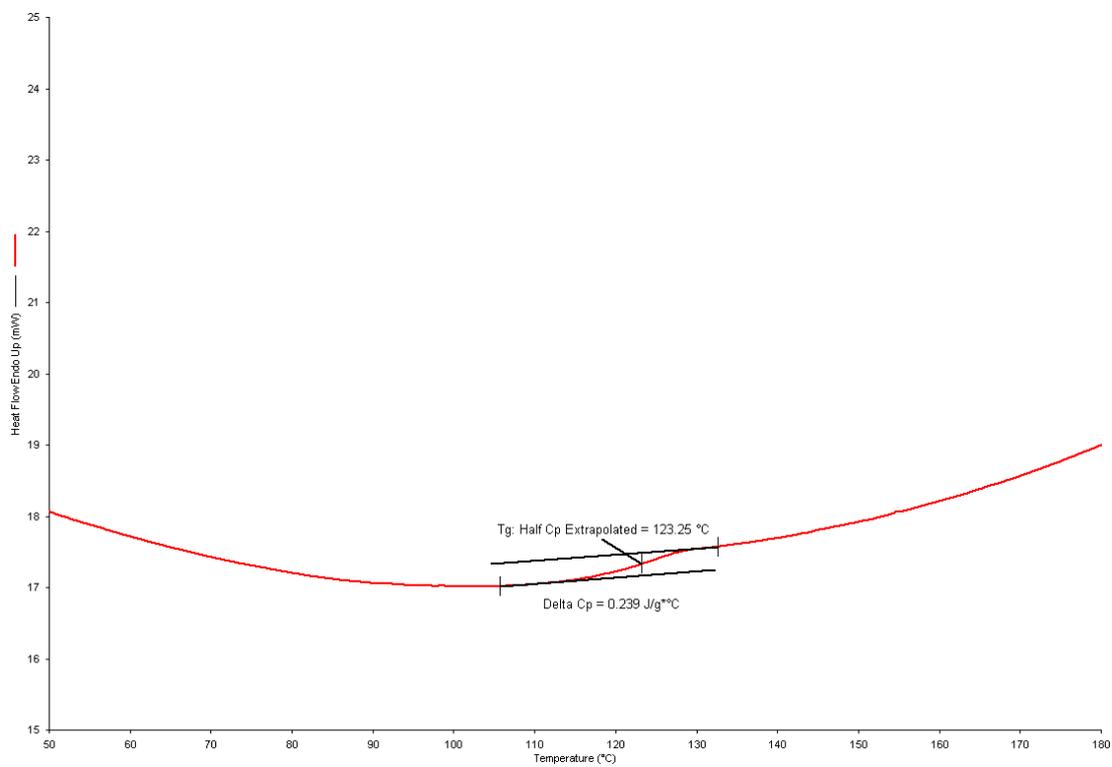


Figura F.1: Termograma de DSC para PMMA (R01).

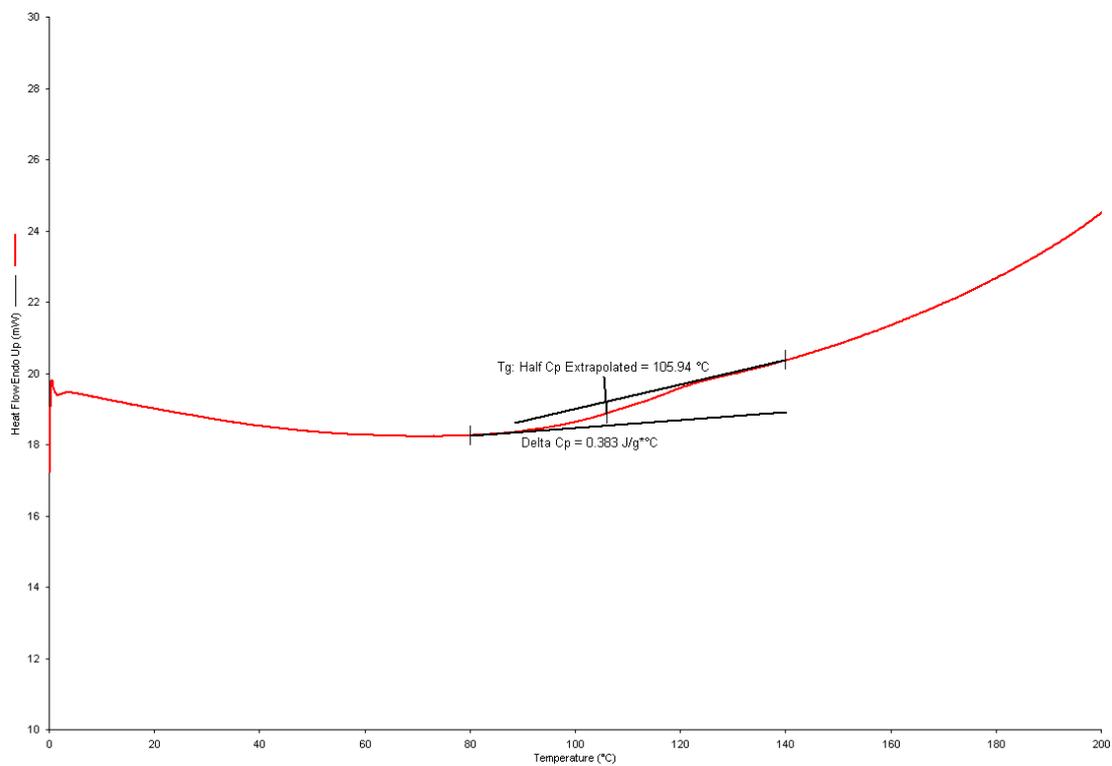


Figura F.2: Termograma de DSC para P(MMA-co-AA) (R04).

APÊNDICE F – Termogramas de DSC

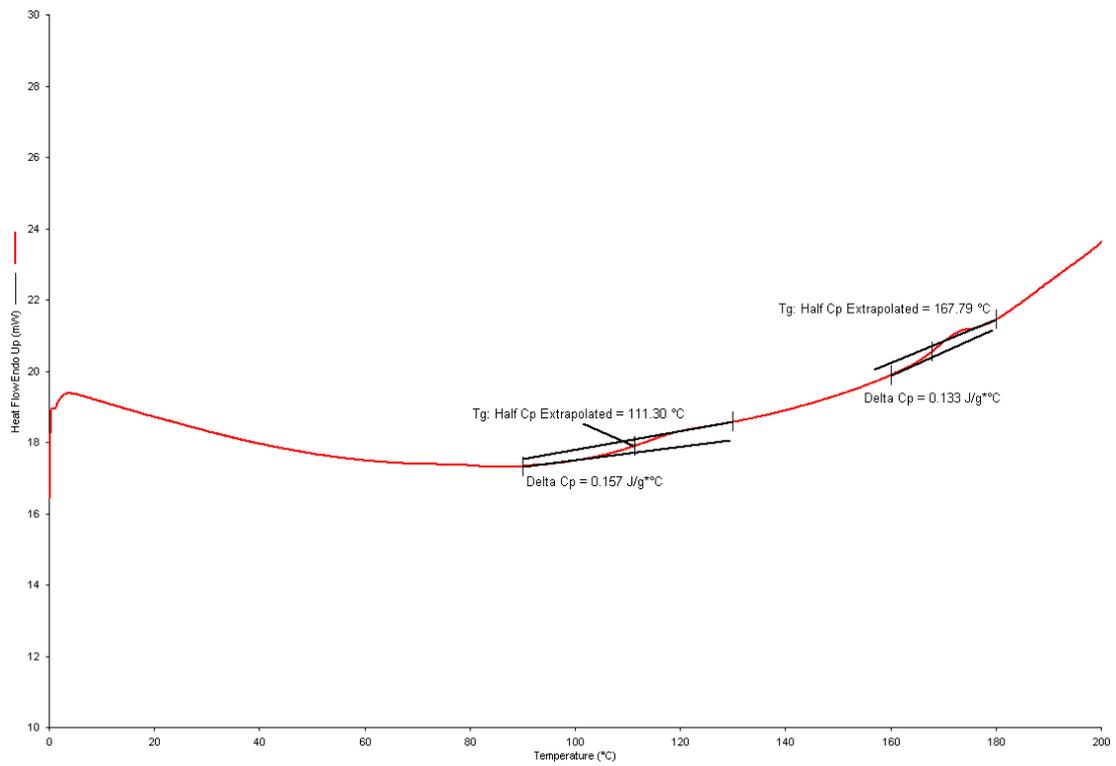


Figura F.3: Termograma de DSC para P(MMA-co-AA) (R05).

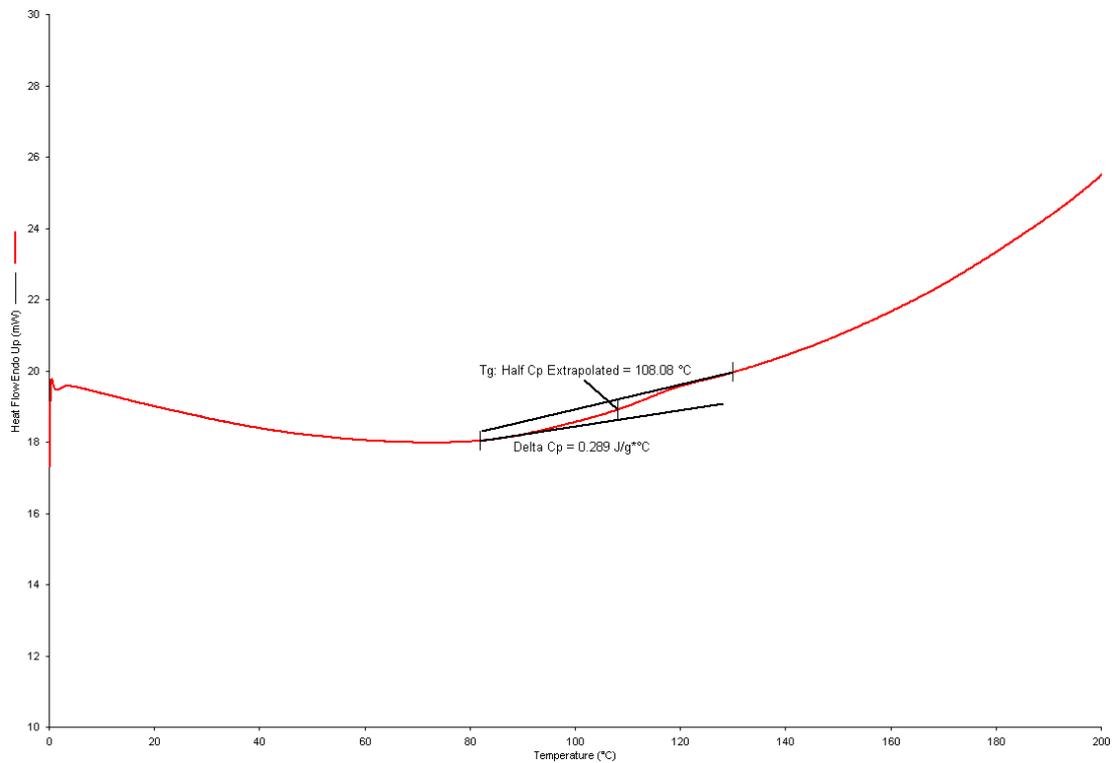


Figura F.4: Termograma de DSC para P(MMA-co-AA) CQ (R10).

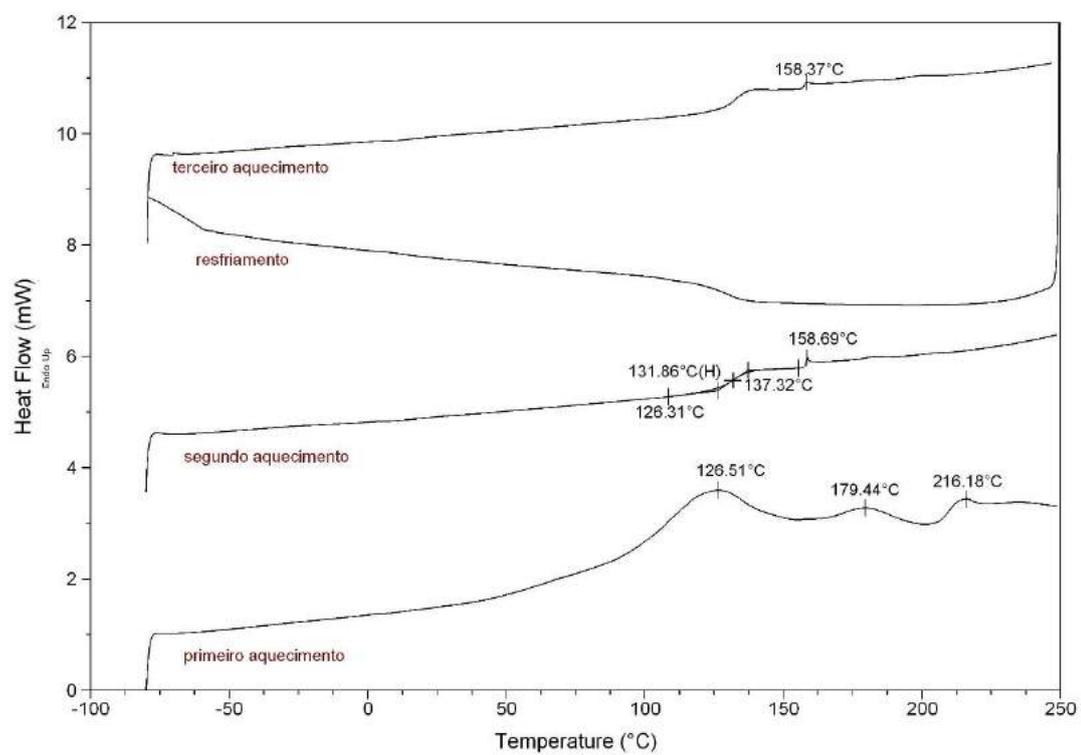


Figura F.5: Termograma de DSC para P(MMA-co-MAA) (R13).

**Cálculo da porcentagem de comonômero incorporada baseado na
Equação de FOX (1956)**

$$\frac{1}{Tg_{copolímero}} = \frac{(1-w)}{Tg_1} + \frac{w}{Tg_2}$$

Sendo que w é fração mássica do monômero.

Dados retirados de RODRIGUEZ *et al.* (2003)

Tg PMMA = 115 °

Tg PAA = 75 °C

Tg PMAA = 228°C

W_{m_{ma}} = 0,85

W_{comonômero} = 0,15

Tabela F.1: Cálculo da porcentagem de comonômero incorporada de acordo com a Equação de FOX (1956).

Amostra	Tg (°C)	% incorporada
PMMA – R01	123,25	-
P(MMA-co-AA) – R04	105,94	25,40
P(MMA-co-AA) – R05	111,3	16,69
P(MMA-co-AA) CQ – R05	108,08	21,82
P(MMA-co-MAA) – R13	137,32	22,30

APÊNDICE G

Espectros de H-RMN e C-RMN

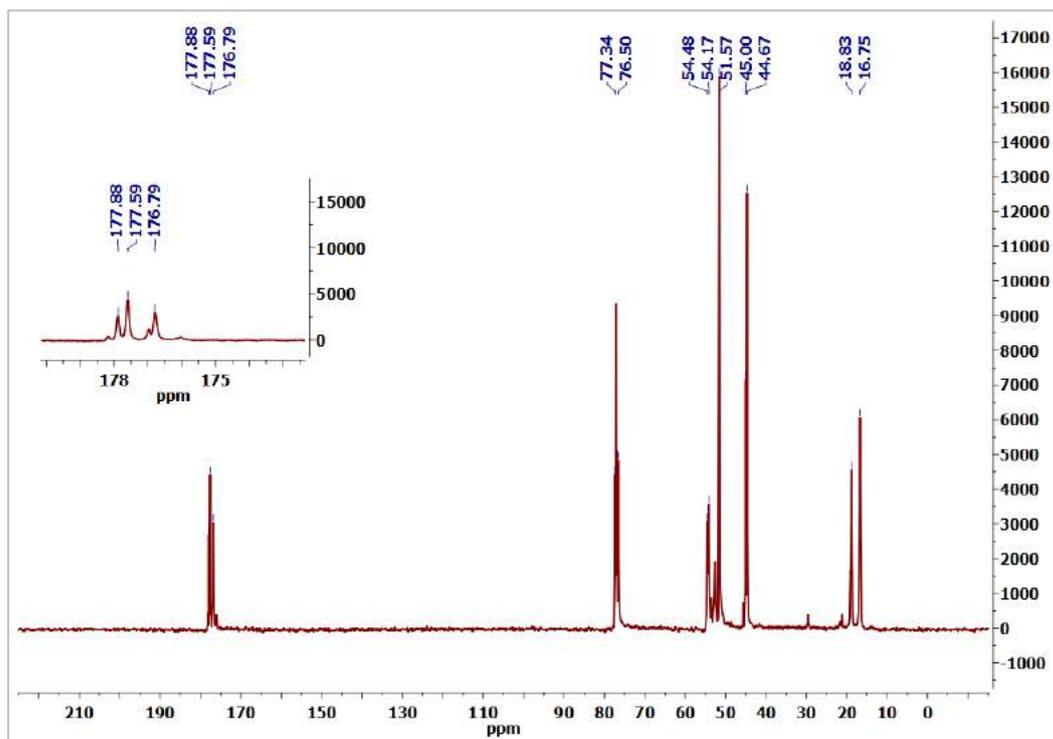


Figura G.1: Espectro de C-RMN da amostra de PMMA (R01); produzida com iniciador KPS.

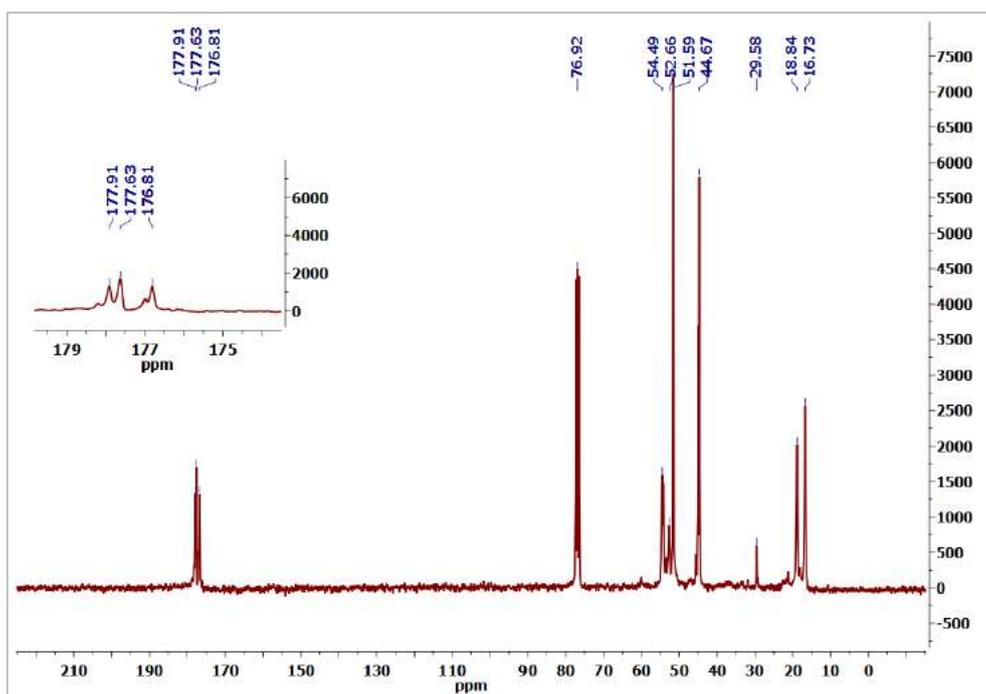


Figura G.2: Espectro de C-RMN da amostra de P(MMA-co-AA) (R04); produzida com 15% de comonômero e iniciador KPS.

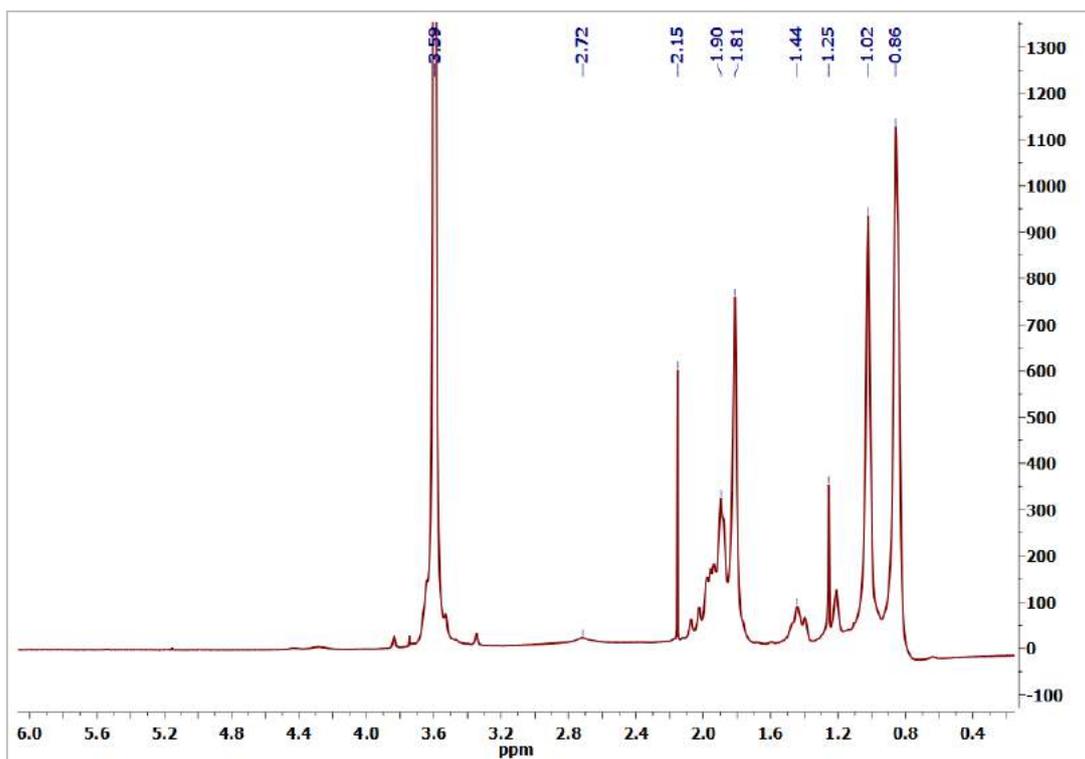


Figura G.3: Espectro de H-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R03); produzida com 7% de comonômero.

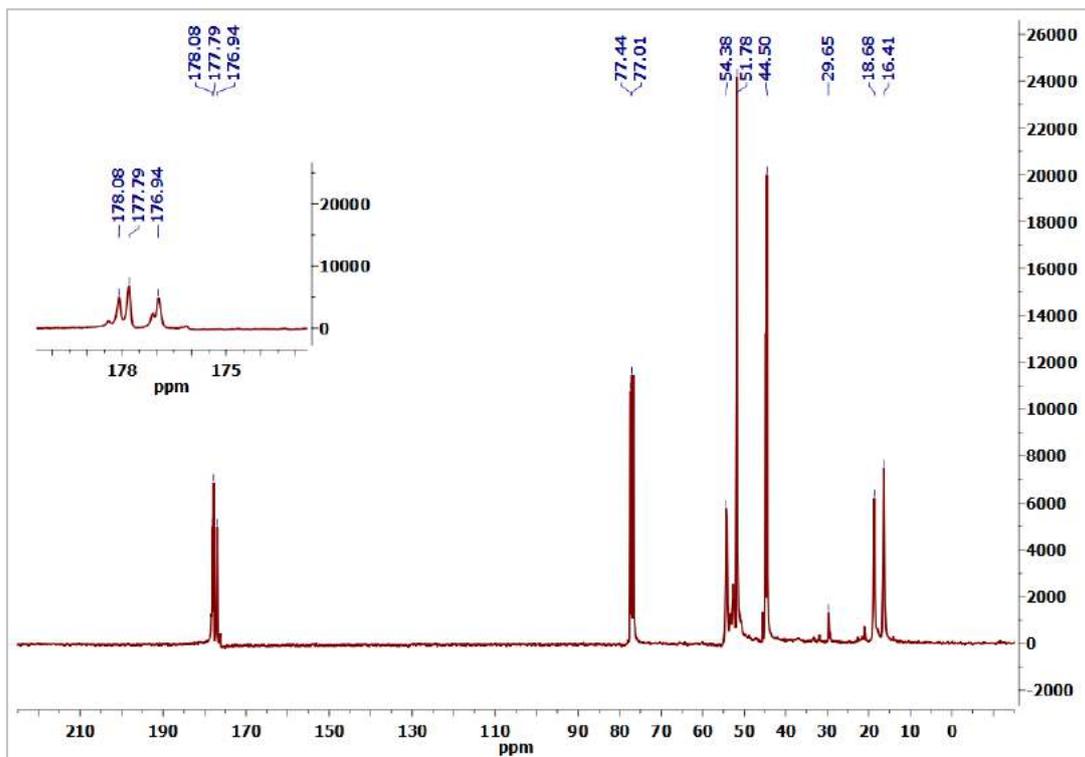


Figura G.4: Espectro de C-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R03); produzida com 7% de comonômero.

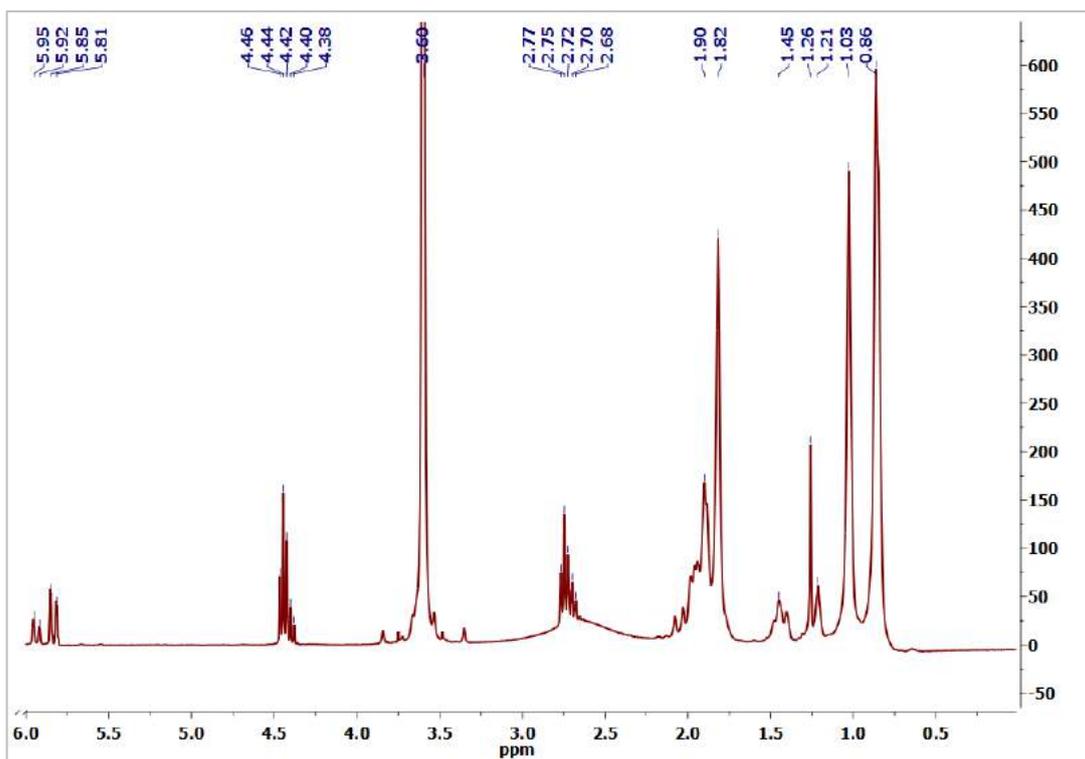


Figura G.5: Espectro de H-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R05); produzida com 15% de comonômero e iniciador PBO.

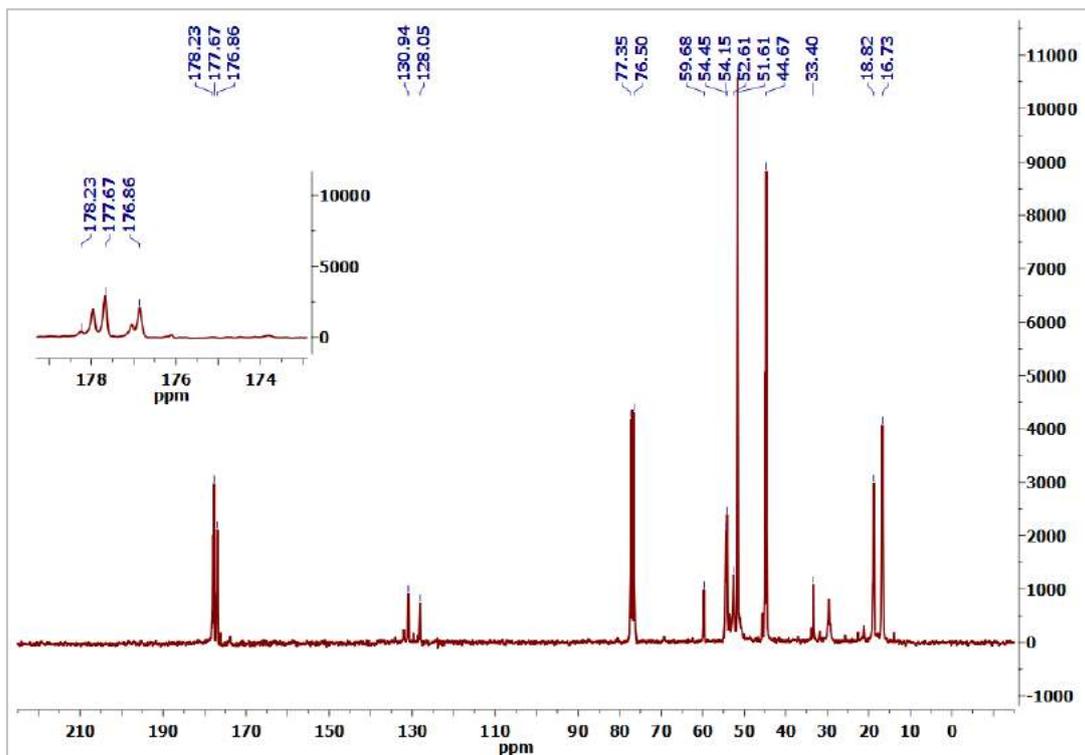


Figura G.6: Espectro de C-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R05); produzida com 15% de comonômero e iniciador PBO.

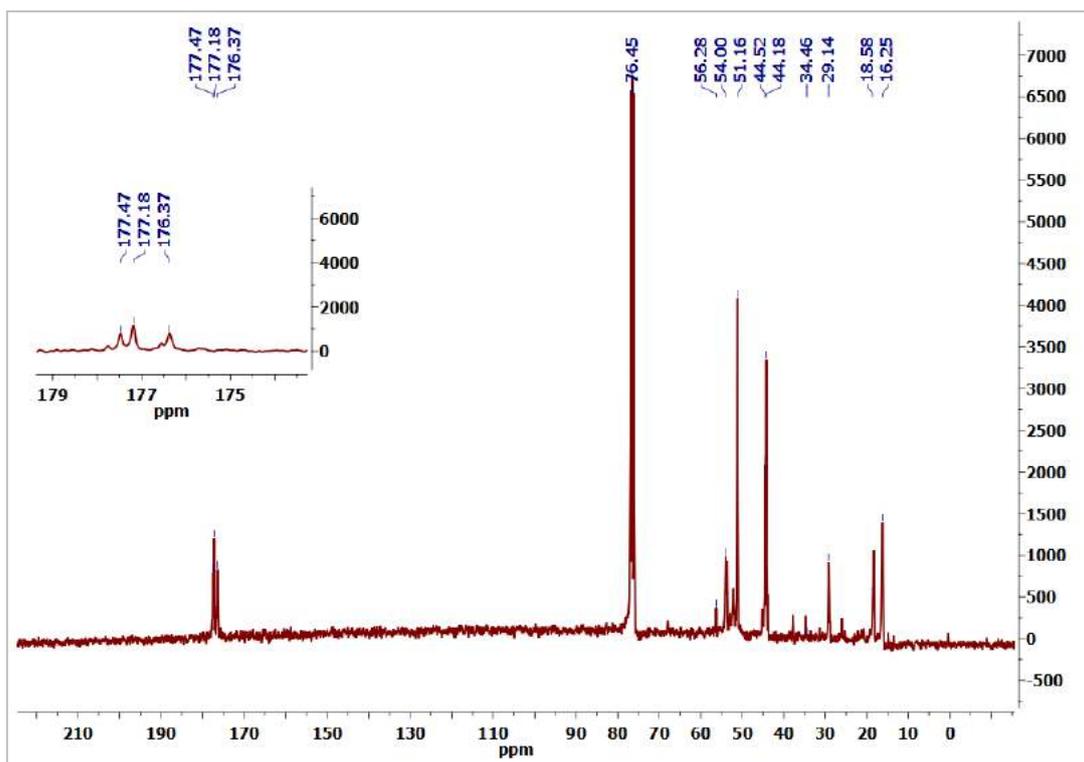


Figura G.7: Espectro de C-RMN amostra de P(MMA-co-AA) (R07) com lisina imobilizada.

APÊNDICE H

Cálculo da porcentagem de comonômero incorporado

Para a reação de copolimerização via radicais livres o seguinte mecanismo pode ser proposto:



O equacionamento para cálculo da porcentagem de comonômero incorporado na copolimerização de acordo com RODRIGUEZ *et al.* (2003) pode ser dado por:

$$\frac{F1}{1-F1} = \frac{\frac{r1f1}{(1-f1)}+1}{\frac{r2(1-f1)}{f1}+1} \quad (H.1)$$

$$f1 = \frac{[m1]}{[m1]+[m2]} \quad (H.2)$$

Em que 1 é referente ao MMA e 2 é referente ao AA; m designa o monômero; $_m1$ é a cadeia em crescimento cujo monômero incorporado foi o 1 e $_m2$ é a cadeia em crescimento cujo o último monômero incorporado foi o 2; K_{ij} é a constante cinética da reação e r é a razão de reatividade ($r1 = K_{11}/K_{12}$ e $r2 = K_{22}/K_{21}$) encontrada em BRANDRUP *et al.* (1999); $F1$ é a composição instantânea do copolímero e $f1$ a composição instantânea do monômero.

Tabela H.1: Cálculo da porcentagem de comonômero incorporado de acordo com as razões de reatividade.

Monômero	Razão de reatividade		[mi] mol/L		f1	F1	F2 = 1-F1
	r1	r2	[m1]	[m2]		% MMA	comonômero incorporado
AA	0,418	1,73	1,7	0,375	0,81927 7	0,6769633	0,323
MAA	0,63	0,25	1,7	0,35	0,82926 8	0,7942844	0,205

APÊNDICE I

Técnicas para avaliação da encapsulamento

A avaliação da eficiência de encapsulamento do fármaco se deu pelas técnicas de filtração/centrifugação em membrana e extração. Em ambos os casos, a concentração de fármaco foi avaliada por medidas em espectrofotômetro UV-VIS, sendo previamente definido o comprimento onda de absorção máxima e a curva de calibração.

Filtração/centrifugação em membrana:

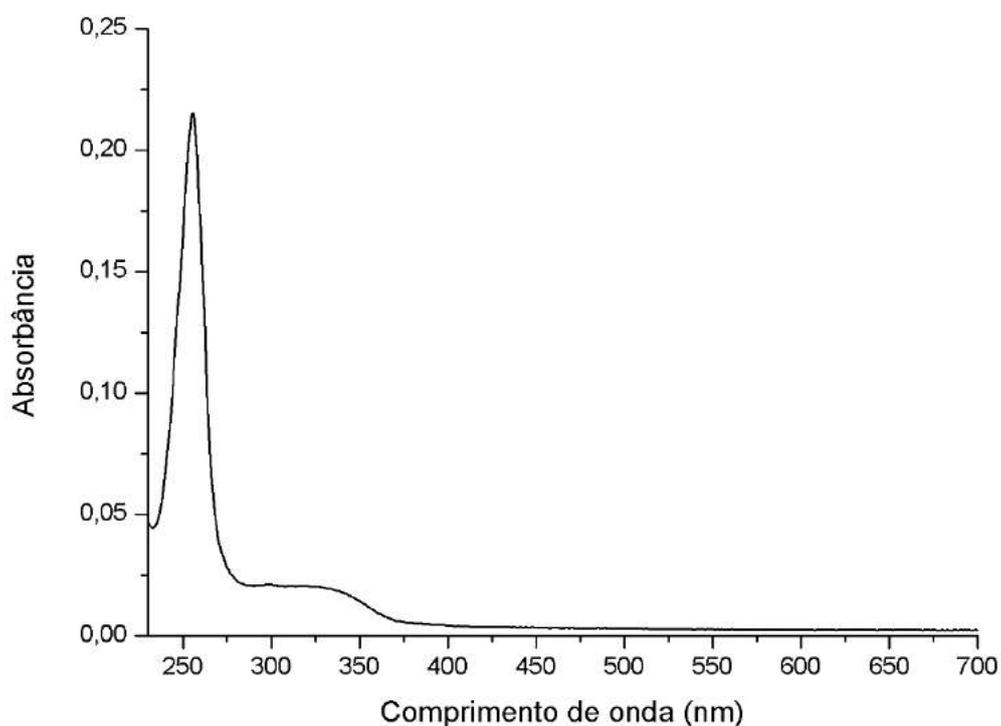


Figura I.1: Espectro de varredura de uma solução 0,1 g/L de clioquinol em solução aquosa contendo surfactante ($\lambda_{\text{máx}} = 256 \text{ nm}$).

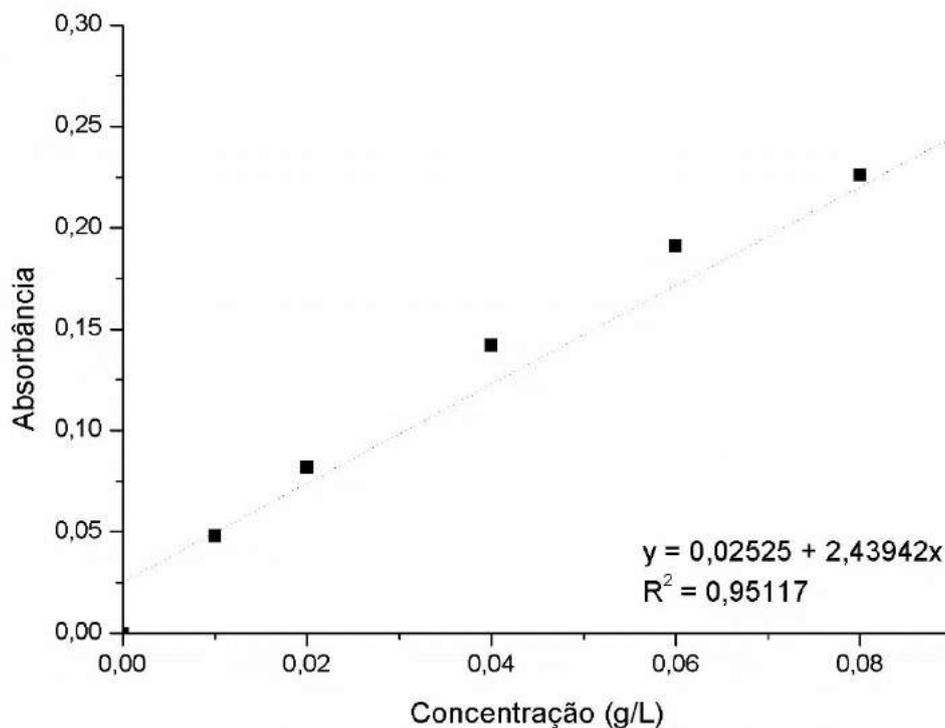


Figura I.2: Curva de calibração para solução de clioquinol em água contendo surfactante.

Extração com etanol:

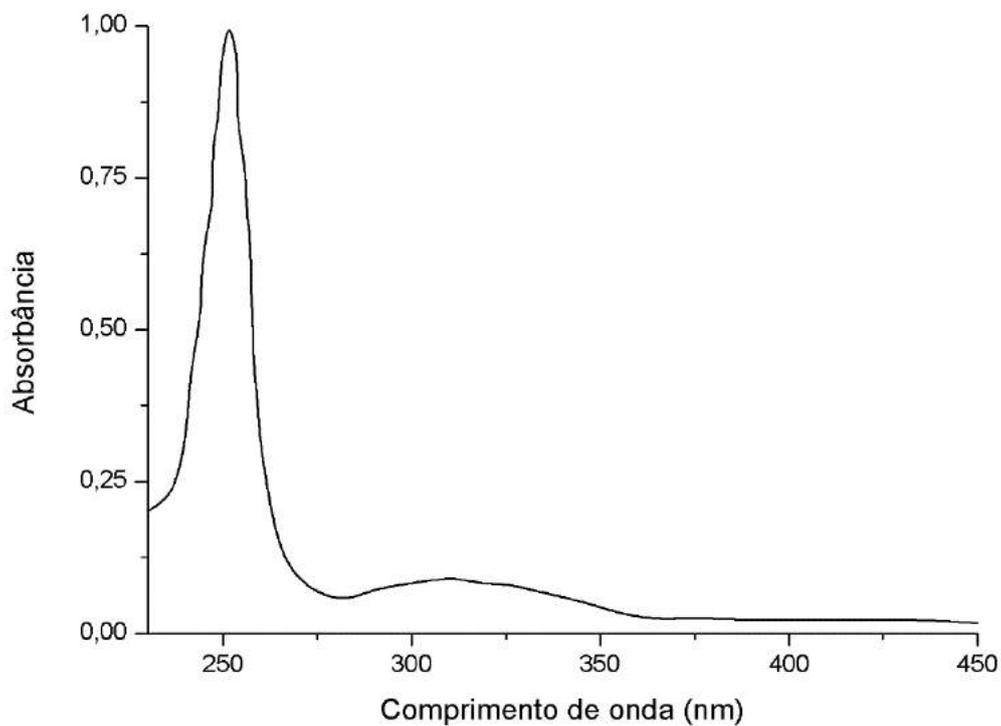


Figura I.3: Espectro de varredura de uma solução 0,1 g/L de clioquinol em etanol ($\lambda_{\text{máx}} = 256 \text{ nm}$).

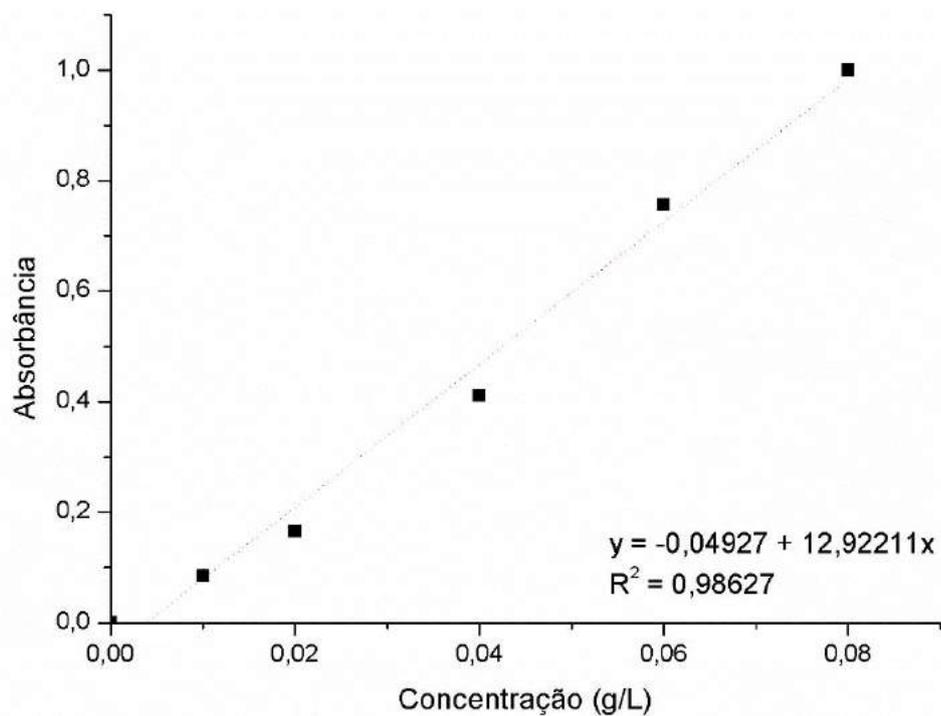


Figura I.4: Curva de calibração para solução de clioquinol em etanol.

APÊNDICE J

Cálculos para adsorção da BSA em uma monocamada

Para o cálculo da relação mássica BSA/Nanopartículas mínima requerida para a formação de uma monocamada pela adsorção, considerou-se que as partículas apresentavam geometria esférica, sendo o diâmetro definido pela análise por espalhamento de luz. Assim, segue o equacionamento.

$$\text{Área da esfera} = \pi \cdot dp^2 \qquad \text{Volume da esfera} = \pi \cdot \frac{dp^3}{6}$$

$$\text{Área total disponível} = n^\circ \text{ de NP} \cdot \text{Área da NP}$$

$$n^\circ \text{ de NP} = \frac{\text{volume de monômero na receita}}{\text{volume de uma gota}} = \frac{\text{massa de monômero na receita}}{\rho_{\text{monômero}}} \cdot \frac{6}{\pi \cdot dp^3}$$

OBS. Na miniemulsão, o volume da gota de monômero inicialmente formada pode ser estimado como o volume da partícula.

Para a BSA, adotou-se uma conformação esférica, sendo seu diâmetro = 7 nm

$$n^\circ \text{ de moléculas de BSA para monocamada} = \frac{\text{Área total disponível}}{\text{Área da BSA}}$$

$$\text{Conc. BSA} = \frac{n^\circ \text{ BSA} \cdot \text{Massa molar BSA}}{n^\circ \text{ Avogadro} \cdot \text{Volume da solução}}$$

Massa molar BSA = 67×10^3 g/mol

$\rho_{\text{monômero}} = 94 \times 10^4$ g/m³

Tabela J.1: Cálculo da quantidade mínima de proteína BSA para formação de uma monocamada.

Amostra	Reação	dp (nm)	A _{total} (m ² /g _{NP})	Nº mol. BSA (mol.BSA/g _{NP})	Razão mássica mínima BSA/NP
PMMA	R06	57,4	111,20	$7,22 \times 10^{17}$	0,0804
P(MMA-co-AA)	R07	109,3	58,40	$3,79 \times 10^{17}$	0,0422
P(MMA-co-AA)	R08	99,6	64,09	$4,16 \times 10^{17}$	0,0463
P(MMA-co-AA)	R09	62,0	102,95	$6,69 \times 10^{17}$	0,0744

