



SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS VIA RAFT FUNCIONALIZADAS
COM BIOMOLÉCULAS MODELO PARA CARREAMENTO DO FÁRMACO
PACLITAXEL

Rayany Stôcco Braido

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Luiz Eduardo Pizarro Borges

Rio de Janeiro
Janeiro de 2020

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS VIA RAFT FUNCIONALIZADAS
COM BIOMOLÉCULAS MODELO PARA CARREAMENTO DO FÁRMACO
PACLITAXEL

Rayany Stôcco Braido

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.

Orientadores: Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.
Prof. Luiz Eduardo Pizarro Borges, D.Sc.

Aprovada por: Prof. Márcio Nele, D.Sc.
Prof. Marcelo Kaminski Lenzi, D.Sc.
Dra. Laís Bastos da Fonseca, D.Sc.
Dra. Débora Vieira Way, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JANEIRO DE 2020

Braido, Rayany Stôcco

Síntese de nanopartículas poliméricas via RAFT funcionalizadas com biomoléculas modelo para carreamento do fármaco Paclitaxel / Rayany Stôcco Braido.

– Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XVII, 144 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Luiz Eduardo Pizarro Borges

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 111-133.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Funcionalização. 3. Liberação de fármacos. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças frente às dificuldades e por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas, que tornaram possível e mais leve a realização desse trabalho.

A meu esposo, Dearley, pelo amor, incentivo, companheirismo, paciência, cobranças e apoio incondicional ao longo desses anos. Você foi meu alicerce nessa jornada. Muito obrigada por ser meu companheiro e amigo em todos os âmbitos da vida.

Agradeço a meus pais, Glória e Braido, pelo apoio, incentivo, carinho, risadas, horas ao telefone e amor incondicional. Ao meu irmão Leonan, que sempre me incentivou e me inspirou por sua inteligência.

A meu orientador José Carlos, por ter compartilhado todo seu conhecimento e experiência, com alegria e amizade inigualável.

A meu orientador Luiz, pelo apoio, confiança, atenção e amizade ao longo dos anos.

Às amigas do Nerds e Divas (Lu, Iza, Debs, Thamis, Maira e Mari), por todo apoio, papos intelectuais e outros nem tanto, pelo abrigo (casa e coração), risadas, discussões, horário de café (cronometrados ou não), viagens a congressos, abraços e “puxões de orelha”. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais difícil. Amo vocês!

A Débora Way, presente que o Engepol e a pesquisa me deram. As reações foram muito mais divertidas e leves ao seu lado. Desculpa, mas que bom que as *click-chemistry* não deram certo... =P Amo você!

A todo grupo EngePol, por compartilharem o conhecimento e por toda ajuda intelectual: Larissa, Nathalie, Gustavo, Martina, Fred, Cazumbá, Rafael, Jéssica, Lys, e tantos outros que contribuíram para que os dias fossem mais leves.

À Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

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

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS VIA RAFT FUNCIONALIZADAS
COM BIOMOLÉCULAS MODELO PARA CARREAMENTO DO FÁRMACO
PACLITAXEL

Rayany Stôcco Braido

Janeiro/2020

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Luiz Eduardo Pizarro Borges

Programa: Engenharia Química

Os materiais poliméricos encontram muitos usos na área biomédica, destacando-se por suas características de biocompatibilidade e versatilidade. Particularmente, o uso de partículas poliméricas que podem ser reconhecidas por receptores de células pode garantir o sucesso de técnicas de liberação controlada e *in situ* de fármacos. O objetivo principal desta tese foi o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, via polimerização radicalar RAFT, funcionalizadas com biomoléculas modelo e o encapsulamento do fármaco paclitaxel. A bioconjugação das partículas foi conduzida por meio da imobilização de três diferentes biomoléculas, usando como técnica a redução do grupo tiocarbonila terminal do agente RAFT e a reação com o ligante maleimida-PEG-NHS. A técnica de polimerização em miniemulsão utilizada permitiu a produção de partículas nanométricas a partir dos monômeros metacrilato de metila e ácido acrílico via polimerização radicalar convencional e RAFT, com tamanhos médio entre 60 e 130 nm. Além disso, comprovou-se o encapsulamento do fármaco paclitaxel com eficiência maior que 90 %. A metodologia de imobilização por reação química, com maleimida-PEG-NHS, foi capaz de promover a bioconjugação das biomoléculas às nanopartículas para posterior ensaio *in vitro* de captação celular, em que foram observadas maiores captações das nanopartículas conjugadas a biomoléculas com maiores massas molares.

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

RAFT SYNTHESIS OF POLYMER NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH
MODEL BIOMOLECULES FOR ENCAPSULATION OF PACLITAXEL

Rayany Stôcco Braido

January/2020

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Luiz Eduardo Pizarro Borges

Department: Chemical Engineering

Polymer materials find many potential uses in the biomedical field, due to the characteristic biocompatibility and versatility. Particularly, polymer particles can be used in applications that require recognition by receptors on cells, ensuring the success of drug target delivery strategies. The main objective of the present work was the development of polymer nanoparticles, by RAFT radical polymerization, functionalized with model biomolecules and loaded with paclitaxel. The functionalization of the particles was performed in the present work through immobilization of three different biomolecules, by reducing the thiocarbonyl terminal group of the RAFT agent and using maleimide-PEG-NHS as a linker. Miniemulsion polymerizations allowed the production of nanoparticles with the monomers methyl methacrylate and acrylic acid through RAFT and conventional radical polymerizations, with average sizes ranging from 60 to 30 nm. Furthermore, paclitaxel encapsulation with efficiency greater than 90 % has been achieved. The immobilization methodology by chemical reaction, using the PEG-NHS-maleimide route, was able to promote bioconjugation of biomolecules to nanoparticles for further in vitro cell uptake assays, when higher uptakes of nanoparticles conjugated to biomolecules with higher molar masses were observed.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XV
CAPÍTULO I	1
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	4
1.3 ESTRUTURA DA TESE	4
CAPÍTULO II	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	7
2.2 PACLITAXEL	11
2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	14
2.4 NANOENCAPSULAÇÃO	19
2.4.1 Polimerização em emulsão e miniemulsão	21
2.5 POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAL LIVRE	28
2.6 POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE VIVA OU CONTROLADA	31
2.6.1 Polimerização RAFT	33
2.7 BIOCONJUGAÇÃO	41
2.8 COMENTÁRIOS FINAIS	46
CAPÍTULO III	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS – NANOPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO	48
3.1 REAGENTES	48
3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	49
3.3 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	50
3.3.1 Reações de polimerização em miniemulsão	51

3.3.2 Avaliação da influência da proporção fase orgânica/fase aquosa na produção das nanopartículas	52
3.3.3 Encapsulamento do fármaco paclitaxel	53
3.4 <i>TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS</i>	54
3.4.1 Conversão por gravimetria.....	54
3.4.2 Distribuição de massa molar.....	55
3.4.3 Tamanho das partículas	56
3.4.4 Análises térmicas.....	57
3.5 <i>EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO</i>	58
3.6 <i>TESTE DE LIBERAÇÃO</i>	59
CAPÍTULO IV	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – NANOPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO ...	61
4.1 <i>REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO</i>	61
4.1.1 <i>Conversão por Gravimetria</i>	61
4.1.2 <i>Tamanho das partículas</i>	63
4.1.3 <i>Distribuição de Massa Molar</i>	65
4.1.4 <i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	68
4.2 <i>ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO PACLITAXEL</i>	69
4.2.1 <i>Conversão e massa molar</i>	72
4.2.2 <i>Tamanho de partículas</i>	78
4.2.3 <i>Análises térmicas</i>	81
4.2.4 <i>Eficiência de encapsulamento</i>	82
4.3 <i>ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO</i>	85
4.4 <i>CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</i>	87
CAPÍTULO V	89
5 MATERIAIS E MÉTODOS – BIOCONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	89
5.1 <i>REAGENTES</i>	89
5.2 <i>EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS</i>	90
5.3 <i>FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS</i>	91
5.3.1 <i>Redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT em tiol</i>	91

5.3.2	<i>Quantificação da concentração de grupos tiol disponíveis</i>	92
5.3.3	<i>Imobilização das biomoléculas</i>	94
5.3.4	<i>Avaliação da eficiência de bioconjugação</i>	96
5.3.5	<i>Ensaio de captação celular</i>	97
CAPÍTULO VI		98
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO – BIOCONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	98
6.1	ENSAIO DE BIOCONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	98
6.1.1	<i>Quantificação da concentração de grupos tiol disponíveis</i>	98
6.1.2	<i>Imobilização das biomoléculas</i>	99
6.2	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	106
CAPÍTULO VII		107
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
7.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
7.2	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	109
CAPÍTULO VIII		111
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
APÊNDICES		134
9	APÊNDICE A	135
10	APÊNDICE B	137
11	APÊNDICE C	139
12	APÊNDICE D	140
13	APÊNDICE E	142
14	APÊNDICE F	143

Lista de Figuras

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	8
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO PACLITAXEL	12
FIGURA 3 - PRINCIPAIS TIPOS DE NANOCARREADORES	15
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS NANOESFERAS E NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS (ATIVO DISSOLVIDO NO NÚCLEO (A) OU ADSORVIDO NA PAREDE POLIMÉRICA (B)).....	16
FIGURA 5 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO POLI(METACRILATO DE METILA).....	18
FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS EMULSÕES ÓLEO EM ÁGUA (O/A) E ÁGUA EM ÓLEO (A/O).....	21
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TAXA DE POLIMERIZAÇÃO COMO FUNÇÃO DA CONVERSÃO DO MONÔMERO PARA POLIMERIZAÇÃO EM EMULSÃO	24
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO	26
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE SISTEMAS DE CLRP, EM QUE “A” REPRESENTA O AGENTE DE TRANSFERÊNCIA DE CADEIA (CTA)	32
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO GENÉRICA DA ESTRUTURA DOS AGENTES DE TRANSFERÊNCIA DE CADEIA RAFT	34
FIGURA 11 - MECANISMO CINÉTICO ESQUEMÁTICO DE POLIMERIZAÇÃO CLRP DO TIPO RAFT	35
FIGURA 12 - EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (M_w/M_n) E DA MASSA MOLAR MÉDIA NUMÉRICA (M_n) EM FUNÇÃO DA CONVERSÃO NA PRESENÇA DE AGENTE MACRO- RADICAL RAFT. A CURVA TRACEJADA REPRESENTA O VALOR TEÓRICO DE M_n	36
FIGURA 13 - EVOLUÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLARES EM FUNÇÃO DA CONVERSÃO NA PRESENÇA DE AGENTE MACRO-RADICAL RAFT	37
FIGURA 14 - ESQUEMA DA FORMAÇÃO DE BLOCOS DE COPOLÍMERO VIA EXTENSÃO DE CADEIA UTILIZANDO A TÉCNICA DE POLIMERIZAÇÃO RAFT.	37

FIGURA 15 - DIFERENTES ESTRUTURAS DE AGENTES DE TRANSFERÊNCIA DE CADEIA TIOCARBONÍLICOS UTILIZADOS EM POLIMERIZAÇÕES RAFT	39
FIGURA 16 - GUIA PARA SELEÇÃO DOS AGENTES RAFT PARA VÁRIAS POLIMERIZAÇÕES. PARA Z, A VELOCIDADE DE ADIÇÃO DIMINUI E A DE FRAGMENTAÇÃO AUMENTA DA ESQUERDA PARA A DIREITA. PARA R, A VELOCIDADE DE FRAGMENTAÇÃO DIMINUI DA ESQUERDA PARA A DIREITA. AS LINHAS PONTILHADAS INDICAM CONTROLE PARCIAL ...	39
FIGURA 17 - ALGUNS TIPOS DE ARQUITETURA QUE PODEM SER SINTETIZADAS COM A TÉCNICA DE POLIMERIZAÇÃO RAFT	40
FIGURA 18 - ILUSTRAÇÃO DE UMA PARTÍCULA POLIMÉRICA CARREGADA COM FÁRMACO E COM VETORES (BIOMOLÉCULAS) NA SUPERFÍCIE	42
FIGURA 19 - ILUSTRAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS MODELO UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE BIOCONJUGAÇÃO.	45
FIGURA 20 - ESQUEMA DO APARATO EXPERIMENTAL USADO PARA CONDUZIR A REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO.....	52
FIGURA 21 - EVOLUÇÃO DA CONVERSÃO NAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO M1 A M4.....	62
FIGURA 22 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULA NOS EXPERIMENTOS M1 A M4...	64
FIGURA 23 - DISTRIBUIÇÕES DE MASSAS MOLARES DOS PRODUTOS DA REAÇÃO M1, NA AUSÊNCIA DO AGENTE RAFT.....	66
FIGURA 24 - DISTRIBUIÇÕES DE MASSAS MOLARES DOS PRODUTOS DA REAÇÃO M2, CONDUZIDA NA PRESENÇA DO AGENTE RAFT.....	67
FIGURA 25 - EVOLUÇÃO DA MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA EM FUNÇÃO DA CONVERSÃO NOS PRODUTOS DAS REAÇÕES M1 (POLIMERIZAÇÃO RADICALAR CONVENCIONAL) E M2 (POLIMERIZAÇÃO RADICALAR RAFT), E EVOLUÇÃO DA MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA TEÓRICA EM FUNÇÃO DA CONVERSÃO DA REAÇÃO M2.....	68
FIGURA 26 - TERMOGRAMAS DOS POLÍMEROS M1, SINTETIZADO POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR CONVENCIONAL, E M2, SINTETIZADO POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR RAFT.....	69

FIGURA 27 - ASPECTO VISUAL DO SISTEMA FORMADO COM O AGENTE RAFT E O FÁRMACO PACLITAXEL, SENDO (A) A SOLUBILIZAÇÃO DO AGENTE RAFT E DO FÁRMACO NO MONÔMERO, (B) A INTERFACE O/A E (C) A PRÉ EMULSÃO OBTIDA APÓS AGITAÇÃO MAGNÉTICA.	71
FIGURA 28 - TERMOGRAMA DE TGA DO FÁRMACO PACLITAXEL.....	71
FIGURA 29 - CURVAS DE CONVERSÃO DAS REAÇÕES R1, R2, R3 E R4.	72
FIGURA 30 - CURVAS DE CONVERSÃO DAS REAÇÕES R3, R4, R5 E R6.	73
FIGURA 31 - CURVAS DE CONVERSÃO DAS REAÇÕES R5, R7, R9 E R11.	74
FIGURA 32 - CURVAS DE CONVERSÃO DAS REAÇÕES R6, R8, R10 E R12.	74
FIGURA 33 - DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES DAS REAÇÕES R1, R2, R3, R4, R5, R6, R11 E R12.....	76
FIGURA 34 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE PARTÍCULA DAS REAÇÕES R1, R2, R3, R4, R5, R6, R11 E R12.	80
FIGURA 35 - TERMOGRAMAS DE TGA DAS AMOSTRAS OBTIDAS AO FINAL DAS REAÇÕES R3, R4, R5, R6, R9 E R10.....	81
FIGURA 36 - TERMOGRAMAS DE DSC PARA AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO DO FÁRMACO PACLITAXEL COM A MATRIZ POLIMÉRICA.	82
FIGURA 37 - CROMATOGRAMAS DE HPLC DO PTX, E PRODUTOS DAS REAÇÕES R3 E R4 EM ACN.....	83
FIGURA 38 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TÉCNICA DE HPLC.....	84
FIGURA 39 - (A) CROMATOGRAMA DE HPLC PARA ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO POLÍMERO R9, 8H; (B) CROMATOGRAMA DE HPLC PARA ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO POLÍMERO R5, 96H.	86
FIGURA 40 - (A) CROMATOGRAMA DE HPLC PARA ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO POLÍMERO R8, 4H; (B) CROMATOGRAMA DE HPLC PARA ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO POLÍMERO R10, 96H.	87
FIGURA 41 - ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA REDUÇÃO DO GRUPO TIOCARBONILA DO AGENTE RAFT A TIOL.....	92

FIGURA 42 - ESQUEMA REACIONAL DE REDUÇÃO DO GRUPO TIOCARBONILA DO AGENTE RAFT A TIOL.	92
FIGURA 43 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO DO REAGENTE ELLMAN.	93
FIGURA 44 - ESQUEMA UTILIZADO NA ETAPA DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GRUPOS TIOL DISPONÍVEIS.	94
FIGURA 45 - ESQUEMA EXPERIMENTAL UTILIZADO NA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.	95
FIGURA 46 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DE IMOBILIZAÇÃO DA BIOMOLÉCULA.	95
FIGURA 47 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CONSTRUÍDA COM O REAGENTE ELLMAN.	99
FIGURA 48 - ESPECTRO DE FTIR DO AMINOÁCIDO LISINA.	102
FIGURA 49 - ESPECTRO DE FTIR DAS NANOPARTÍCULAS (R2) ANTES E APÓS O ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO COM LISINA.	103
FIGURA 50 - COMPARAÇÃO ENTRE AS TRANSMITÂNCIAS DO PMMA E DO PMMA CONJUGADO À BIOMOLÉCULA LISINA.	104
FIGURA 51 - ENSAIOS DE CAPTAÇÃO CELULAR.	105
FIGURA B.1 - DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHOS DE PARTÍCULA DA REAÇÃO R7, POLIMERIZAÇÃO RADICALAR CONVENCIONAL – P(MMA-CO-AA) + 0,75% PTX.	137
FIGURA B.2 - DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHOS DE PARTÍCULA DA REAÇÃO R8, POLIMERIZAÇÃO RADICALAR RAFT – P(MMA-CO-AA) + RAFT + 0,75% PTX.	137
FIGURA B.3 - DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHOS DE PARTÍCULA DA REAÇÃO R9, POLIMERIZAÇÃO RADICALAR CONVENCIONAL – P(MMA-CO-AA) + 0,5% PTX.	138
FIGURA B.4 - DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHOS DE PARTÍCULA DA REAÇÃO R10, POLIMERIZAÇÃO RADICALAR RAFT – P(MMA-CO-AA) + RAFT + 0,5% PTX.	138
FIGURA D.1 - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES PARA A REAÇÃO R7 - P(MMA-CO-AA) + 0,75% PTX.	140

FIGURA D.2 - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES PARA A REAÇÃO R9 - P(MMA-CO-AA) + RAFT + 0,75% PTX.....	140
FIGURA D.3 - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES PARA A REAÇÃO R9 - P(MMA-CO-AA) + 0,5% PTX.....	141
FIGURA D.4 - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLARES PARA A REAÇÃO R10 - P(MMA-CO-AA) + RAFT + 0,5% PTX.....	141

Lista de Tabelas

TABELA 1 - COMPOSIÇÕES INICIAIS USADAS NAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO.	53
TABELA 2 - COMPOSIÇÕES USADAS NAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO PARA ENCAPSULAMENTO DO PACLITAXEL.	54
TABELA 3 - CONDIÇÕES USADAS PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DO PACLITAXEL.	59
TABELA 4 - MASSAS MOLARES NUMÉRICA (M _n) E PONDERAL (M _w) E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO FINAIS DOS PRODUTOS OBTIDOS NAS REAÇÕES M1 E M2	66
TABELA 5 – REAÇÕES DE ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO PACLITAXEL.....	70
TABELA 6 - RESULTADOS DE MASSAS MOLARES NUMÉRICA TEÓRICA E CALCULADA E ÍNDICES DE POLIDISPERSÃO DOS PRODUTOS APÓS 5 HORAS DE REAÇÃO.	77
TABELA 7 – TAMANHOS MÉDIOS DAS NANOPARTÍCULAS PRODUZIDAS.	78
TABELA 8 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.	84
TABELA 9 - AMOSTRAS PREPARADAS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO COM CLORIDRATO DE CISTEÍNA.	94
TABELA 10 - ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÃO (MOL/L) DE SULFIDRILA LIVRE.	99
TABELA 11 - RESULTADOS DE EFICIÊNCIA DE BIOCONJUGAÇÃO PARA AS REAÇÕES CONDUZIDAS COM O REAGENTE MALEIMIDA-PEG-NHS	100
TABELA 12 - PRINCIPAIS BANDAS DE FTIR ASSOCIADAS AO SISTEMA ESTUDADO.....	101
TABELA E. 1 - TABELA DE DADOS PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFIDRILAS LIVRES	142
TABELA F.1 - SEQUÊNCIA DE DILUIÇÃO PARA MONTAGEM DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	143
TABELA F.2 - SEQUÊNCIA DE DILUIÇÃO PARA MONTAGEM DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	144

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido acrílico
ACN	Acetonitrila
AIBN	Azobisisobutironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASGPR	Asialoglicoproteína
ASTM	American Society for Testing Materials
ATRP	Polimerização radicalar por transferência de átomos
BSA	Albumina de soro bovino
BSC	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
CMC	Concentração micelar crítica
CPBD	2-ciano-2-propil-benzoditioato
DMSO	Dimetrilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTP	Distribuição de tamanho de partículas
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbiimida
ENGEPOL	Laboratório de Engenharia de Polímeros
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LYS	Lisina
MMA	Metacrilato de metila
NHS	N-hidroxi-succinimida

NMP	Polimerização mediada por nitróxido
O/A	Orgânica / aquosa
PBS	Tampão fosfato salino
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Poli(etileno glicol)
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)
PTX	Paclitaxel
PVAc	Poli(acetato de vinila)
PVAc-co-PMMA	Poli(acetate de vinila-co-metacrilato de metila)
RAFT	Transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAT	<i>Trans-activating trasncriptor</i>
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxila
THF	Tetrahidrofurano
TGA	Termogravimetria
UV-VIS	Ultravioleta - visível

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

A aplicação de fármacos em altas dosagens é frequentemente necessária, levando a indesejados efeitos secundários e a elevado número de administrações. Nos últimos anos a procura por novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito intensa, no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes. Nesse contexto, o desenvolvimento de materiais poliméricos contribuiu de forma significativa para o progresso de diversas tecnologias nesta área. Sistemas de liberação controlada permitem a absorção e liberação da substância ativa de maneira controlada, evitando a aplicação de elevado número de doses em concentrações críticas, além de permitir o direcionamento do fármaco a sítios específicos, quando bioconjugados a marcadores biológicos (KIM *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2012; PARK, 2014; NICOLAS *et al.*, 2007).

Faz cerca de vinte anos que uma nova ferramenta para a síntese de polímeros com arquiteturas moleculares controladas vem sendo desenvolvida: a polimerização radicalar viva ou controlada (CLRP). Por meio desta técnica de polimerização, monômeros funcionais podem ser incorporados à cadeia, produzindo polímeros com diferentes arquiteturas moleculares, como nas polimerizações iônicas vivas. Devido à elevada robustez e flexibilidade desta técnica, bem como à compatibilidade com diferentes grupos funcionais e condições de operação, as CLRPs vêm se transformando rapidamente em tecnologia madura, constituindo uma ferramenta valiosa para a produção de bioconjugados polímero-proteína/peptídeo (KLOK, 2005; NICOLAS *et al.*, 2007). A variante da CLRP considerada mais robusta é a polimerização RAFT (transferência reversível por adição e fragmentação), que se baseia em uma reação de

polimerização radicalar conduzida na presença de agentes de transferência de cadeia (CTA ou agente RAFT) que fazem com que as cadeias poliméricas cresçam de forma lenta e uniforme. Além disso, a polimerização RAFT permite posterior conjugação da cadeia polimérica a moléculas sintéticas ou biológicas (MOAD *et al.*, 2005).

A conjugação da partícula polimérica com uma molécula biológica é a chave para a vetorização de fármacos inclusos em nanopartículas polimerizadas via RAFT. Uma das patologias em que a aplicação destes nanotransportadores bioconjugados se mostrou muito promissora é o câncer. Esta doença se caracteriza pela proliferação de células, vascularização descontrolada dos tecidos e pela capacidade de invasão celular (metástase), estando associada a elevada taxa de mortalidade (ALMEIDA *et al.*, 2005). Dentre as mais diversas alternativas de quimioterapia para o tratamento do câncer, o Paclitaxel, conhecido comercialmente como Taxol®, é utilizado como terapia antineoplásica para vários tipos de tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, ovário, pulmão, cabeça, pescoço e leucemias agudas (SPENCER & FAULDS, 1994). No entanto, sua solubilidade é menor que 0,1 µg/mL em água, o que afeta seriamente sua biodisponibilidade. Além disso, estudos mostraram que 90% do fármaco foi metabolizado por enzimas hepáticas e eliminado pelas fezes. Assim, é necessário ainda melhorar a biodisponibilidade do paclitaxel com novas tecnologia de preparação (WU *et al.*, 2018; ABRIATA *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2014; ALQAHTANI *et al.*, 2019; CRESTEIL *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 1994).

Neste contexto, o presente trabalho pretende desenvolver nanopartículas poliméricas para o encapsulamento e transporte de fármacos via polimerização RAFT, especificamente o paclitaxel, e imobilizar biomoléculas modelos na superfície das partículas, utilizando como ligante a molécula maleimida-PEG-NHS, na ausência de solventes tóxicos. A polimerização RAFT é importante para permitir a síntese controlada das moléculas de polímero e introduzir o grupamento tiol na molécula. A imobilização de moléculas de origem biológica tem o objetivo de permitir o uso posterior das

partículas em aplicações sítio-dirigidas. A ausência de solventes tóxicos é importante para as aplicações médicas e farmacêuticas pretendidas.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol), do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, sendo parte da linha de pesquisa relativa ao uso de polímeros para aplicações biomédicas. De modo geral, o grupo apresenta experiência acumulada nas áreas de polímeros para aplicações biomédicas, 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) e PAIVA (2019), que trabalharam com o encapsulamento de praziquantel em partículas produzidas via miniemulsão; WAY *et al.* (2019) e PEIXOTO (2013), que exploraram a copolimerização para a produção de nanopartículas poliméricas para a imobilização de proteínas; PINTO *et al.* (2014), que desenvolveram suportes poliméricos para catalisadores enzimáticos; e CAMPOS-RAMOS (2018), que desenvolveu nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação do fármaco clioquinol no sistema nervoso central, visando ao tratamento de doenças neurodegenerativas.

A originalidade principal do trabalho está associada ao encapsulamento do fármaco paclitaxel em um polímero sintetizado via polimerização RAFT, de modo a aumentar a biodisponibilidade do fármaco, mas sem afetar na reação de polimerização. Além disso, o trabalho busca mostrar a eficiência da bioconjugação de biomoléculas modelo com diferentes massas molares pela rota química que utiliza maleimida-PEG-NHS, tendo em vista a importância deste processo para o desenvolvimento de sistemas *drug delivery*.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a rota química que utiliza maleimida-PEH-NHS como ligante para a funcionalização de nanopartículas de PMMA e encapsular o fármaco modelo (paclitaxel) nas nanopartículas poliméricas, produzidas por polimerização radicalar (RAFT). A imobilização será conduzida com três diferentes ligantes modelos (lisina, glutatona e insulina), com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco sítio-dirigido.

Dentre os objetivos específicos perseguidos no presente trabalho, podem ser citados:

- avaliar o efeito do agente RAFT na produção de nanopartículas de PMMA via polimerização em miniemulsão;
- investigar o encapsulamento *in situ* de um fármaco modelo (paclitaxel) e o efeito sobre o andamento da reação e do processo;
- avaliar o perfil de liberação do fármaco modelo encapsulado;
- funcionalizar a superfície das nanopartículas, utilizando como ligantes a lisina, a glutatona e a insulina, separadamente;
- avaliar a eficiência de funcionalização das biomoléculas na superfície das nanopartículas;
- realizar ensaios de captação celular para avaliação de desempenho biológico dos sistemas propostos.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese de doutorado está dividida em oito capítulos e organizada de acordo com a cronologia de realização dos experimentos, seguindo uma ordem cronológica de pesquisa.

Este primeiro capítulo apresenta um breve relato sobre a motivação e os objetivos pretendidos com o desenvolvimento do estudo. No Capítulo II apresenta-se a fundamentação teórica a respeito dos temas abordados ao longo deste estudo, visando contextualizar e justificar o trabalho proposto. A fundamentação é baseada na apresentação de alguns dos principais estudos desenvolvidos na área de sistemas poliméricos para liberação de fármacos e das técnicas empregadas para a produção das nanopartículas. A funcionalização das nanopartículas é também abordada, como ferramentas para permitir a liberação sítio-dirigida do fármaco.

O Capítulo III se inicia com a descrição da metodologia experimental adotada para realização das reações de polimerização para encapsulamento do fármaco e as análises de caracterização avaliadas dos materiais obtidos. Dentre as técnicas de caracterização, citam-se medidas de conversão e massas molares, distribuição de tamanhos de partícula, análises térmicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de termogravimetria (TGA), além da eficiência de encapsulamento e liberação *in vitro* do fármaco. O Capítulo IV apresenta os principais resultados obtidos nas reações de polimerização e encapsulamento do fármaco.

A metodologia para os ensaios de bioconjugação é apresentada no Capítulo V. Este capítulo descreve o ensaio de redução do grupo tiocarbonila em sulfidril livre, para posterior conjugação ao espaçador e às biomoléculas, além das metodologias usadas nos ensaios de captação celular. Os resultados dos ensaios de bioconjugação e captação celular são descritos no Capítulo VI.

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

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) do Programa de Engenharia Química da COPPE da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PEQ/COPPE/UFRJ), tendo a colaboração dos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Cromatografia e Adsorção (LabCads/UFRJ), para as análises de HPLC;
- Laboratório de Microbiologia Celular (Fundação Oswaldo Cruz), para os ensaios de captação celular.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Por definição, um “sistema de liberação de fármacos” (SLF) é um mecanismo através do qual o princípio ativo presente em uma forma terapêutica é disponibilizado no organismo em que deve ser liberado e/ou absorvido após a administração (ANSEL *et al.*, 1999; BASSYOUNI *et al.*, 2013). Estes sistemas visam melhorar a solubilidade aquosa e a estabilidade dos agentes ativos, aumentar a atividade farmacológica e reduzir os efeitos colaterais (LI *et al.*, 2019).

Quando substâncias farmacologicamente ativas são veiculadas por sistemas de liberação convencionais, geralmente não conseguem alcançar a concentração uniforme e compatível com a dose no tecido alvo do organismo, uma vez que existem diversas barreiras biológicas entre o local de aplicação e o local onde o ativo deve exercer o efeito, que reduzem a concentração atingida e expõem também os tecidos saudáveis do organismo aos efeitos tóxicos do fármaco (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Além disso, as concentrações plasmáticas dos fármacos são diretamente proporcionais à dose administrada; ou seja, a concentração do fármaco atinge um pico logo após a administração e então declina, por conta dos mecanismos de defesa. Cada fármaco apresenta uma faixa característica de ação terapêutica, sendo tóxico acima desta faixa e ineficaz abaixo. Desta forma, para sustentar efeitos terapêuticos necessários por períodos de tempo prolongados, múltiplas administrações são usualmente empregadas, aumentando a possibilidade de efeitos colaterais indesejáveis, em função dos picos de concentração (KIM *et al.*, 2009). Por isso, diversos estudos vêm sendo realizados para

desenvolver novas tecnologias que tornem mais eficientes os sistemas de liberação de fármacos.

Na liberação modificada, busca-se o desenvolvimento de um sistema que mantenha a concentração do medicamento na corrente sanguínea dentro da faixa terapêutica; ou seja, entre os níveis mínimo e máximo desejados, como mostra a Figura 1 (KIM *et al.*, 2009; BASSYOUNI *et al.*, 2013; PARK, 2014). Além disso, com o desenvolvimento destas novas tecnologias, pretende-se preparar materiais que sejam capazes de proteger e controlar a liberação de fármacos e de outros compostos terapêuticos, como proteínas e genes (SUN *et al.*, 2017).

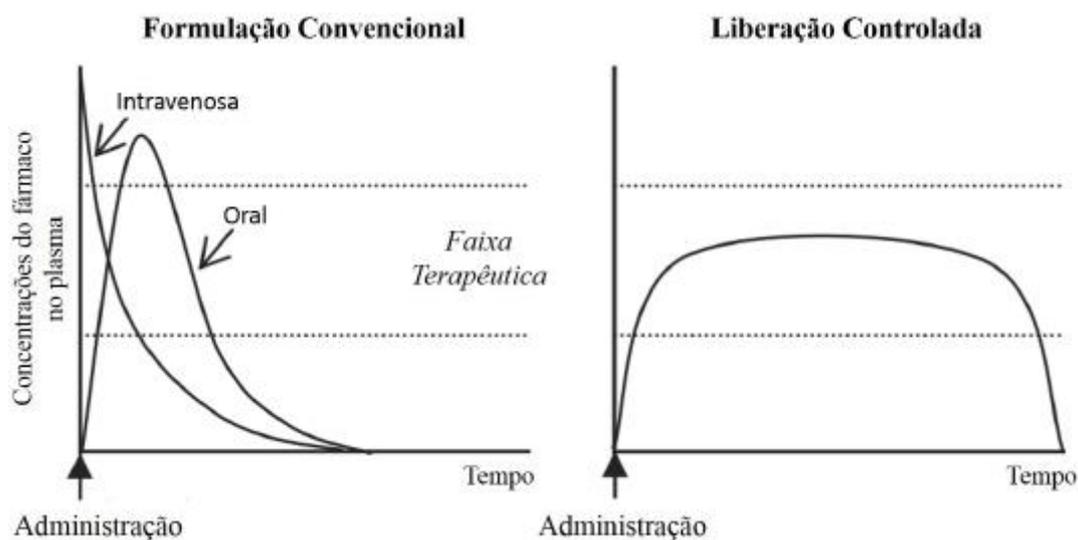


Figura 1 - Representação esquemática do perfil de liberação de fármacos (adaptada de KIM *et al.*, 2009; PAIVA, 2019).

Os materiais poliméricos são muito utilizados em estudos de sistemas de liberação, em função do caráter versátil e facilmente manipulável dos polímeros, que os tornam adaptáveis às necessidades específicas do sistema (TIAN *et al.*, 2012). No caso da liberação modificada, os sistemas transportadores de fármacos são capazes de compartimentar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deve exercer o efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (KIM *et al.*, 2009).

Adicionalmente ao controle e programação da liberação do fármaco, capaz de prolongar a concentração plasmática na dose terapêutica ótima, a liberação no local específico é outra importante vantagem dos sistemas de liberação controlada (KIM *et al.*, 2009). Nos últimos anos muito tem se falado a respeito de sistemas de liberação sítio-dirigidas. A liberação sítio-dirigida ou *in situ* permite que o fármaco seja levado até um local específico do tecido celular. Para que isso ocorra, os carreadores são modificados superficialmente, de forma que uma determinada biomolécula permita o reconhecimento do alvo e a liberação do fármaco ocorra no local desejado. Vale ressaltar que nem sempre a liberação sítio-dirigida visa a controlar a taxa de liberação do fármaco, como nos sistemas de liberação controlada. Usualmente os sistemas sítio-dirigidos podem ser alcançados com auxílio de estratégias de direcionamento a um alvo, o que é conhecido como vetorização (DUMITRIU, 2001; DREW UNIVERSITY, 2014).

São duas as estratégias de direcionamento mais empregadas nos sistemas de liberação sítio-dirigida. Uma delas, a sinalização ativa, emprega vetores ou ligantes direcionais, como anticorpos, aptâmeros¹ e outras biomoléculas. A outra, a sinalização passiva, age em consonância com o efeito de evidenciada permeabilidade e retenção (EPR) (KIM *et al.*, 2009).

O EPR é evidenciado em certas circunstâncias como, por exemplo, na presença de tumores sólidos. CHO e colaboradores (2008) discutem que tumores são usualmente circundados por novas redes de vascularizações para garantir suprimento de oxigênio e nutrientes para o crescimento acelerado das células. A vascularização tumoral, no entanto, ocorre de forma tão rápida que não permite a reorganização adequada, o que possibilita o surgimento de espaços vazios entre as células e faz com que o tumor se torne altamente permeável (FANG *et al.*, 2011). Paralelamente, outra consequência do crescimento acelerado é a ausência de drenagem linfática na região tumoral, que

¹ São pequenos trechos de DNA ou RNA que se ligam especificamente a moléculas alvo específicas.

ocasiona uma retenção de 10 a 200 vezes maior das moléculas que conseguem permear as células doentes, quando comparado a células saudas (efeito EPR) (MAEDA *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2011). Como resultado do aumento da permeabilidade vascular, partículas poliméricas, micelas ou lipossomos com tamanhos característicos na faixa de 10 a 500 nm e carregados com fármacos anticancerígenos podem levar tais fármacos ao interior dos tecidos afetados. Por isso, o efeito EPR vem sendo bastante estudado para esta finalidade.

Sabe-se que as células saudas também apresentam alguma permeabilidade e solubilidade em relação ao fármaco, fazendo com que as drogas que são usadas na quimioterapia sejam absorvidas tanto por células saudas quanto pelas células doentes. Desta forma, para que o efeito EPR seja mais bem aproveitado, idealmente as moléculas não devem apresentar baixa massa molar (da ordem de centenas de Da), para que penetrem apenas nas células doentes (MAEDA *et al.*, 2001).

Os sistemas baseados somente no efeito EPR não são, contudo, completamente eficientes. Segundo CHO *et al.* (2008), estes sistemas interagem com dificuldade com as células tumorais mais profundas, além de requererem expressivas quantidades de fármacos para atingir a dose terapêutica. Devido à rápida proliferação, células tumorais superexpõem diferentes receptores, tais como o ácido fólico, vitaminas e açúcares, para aumentar a taxa de absorção de nutrientes (CHO *et al.*, 2008). Portanto, o mais indicado é combinar a sinalização passiva com a sinalização ativa, visando à potencialização do desempenho do sistema de liberação.

A sinalização ativa consiste em ligar química ou fisicamente uma biomolécula à superfície dos sistemas de liberação. A biomolécula deve ser escolhida de maneira adequada a cada caso, para que atue de maneira específica em cada tipo de receptor. Isso ocorre porque cada tumor, no caso das neoplasias, secreta e absorve alguns tipos de substâncias em maior quantidade que as demais células. Por isso, um vetor específico para o câncer de mama, por exemplo, dificilmente é eficiente para atuar no tratamento do tumor de câncer de fígado, estômago ou próstata (MAEDA *et al.*, 2009).

Os receptores presentes na membrana celular permitem que elas respondam aos estímulos provocados no ambiente, melhorando significativamente o índice terapêutico e a redução da toxicidade. A ligação entre os receptores celulares e os respectivos ligantes, que podem incluir proteínas, peptídeos e até moléculas sintéticas, é rigorosamente controlada pelas interações físicas, eletrostáticas, hidrofóbicas e hidrofílicas entre as moléculas (RODDA *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 2011; MAEDA *et al.*, 2009).

Uma preocupação relevante diz respeito à capacidade de o sistema final penetrar nas células quando estiver vetorizado com biomoléculas, uma vez que, ao ligar a biomolécula à superfície, o conjunto aumenta consideravelmente de tamanho. Há relatos de que moléculas de 20 a 800 kDa foram capazes de penetrar as células doentes (MAEDA *et al.*, 2009; SEYMOUR *et al.*, 1995). Além disso, estudos revelaram que partículas com tamanhos variando entre 200 nm e 1,2 µm penetraram nos tumores (DUNCAN, 1999). Desta forma, o tamanho do sistema de liberação constitui um parâmetro também importante para a aplicação de liberação controlada, pois influencia diretamente a penetração das partículas nos interstícios dos tumores, no efeito EPR e nas taxas de depuração. O tamanho das partículas, polímero e biomolécula deve estar usualmente na faixa entre 50 a 150 nm, de forma a ser grande o suficiente para evitar a entrada em tecidos saudáveis e pequena o suficiente para adentrar nos interstícios dos vasos sanguíneos tumorais (MARCUCCI e LEFOULON, 2004).

2.2 PACLITAXEL

O Paclitaxel (PTX) foi isolado por volta de 1960 da casca da *Taxus brevifolia*, conhecida popularmente por Teixo do Pacífico ou Teixo Ocidental. Em 1971, a estrutura do paclitaxel (Figura 2) foi publicada, permitindo a fabricação semissintética nos dias atuais, retirando das folhas de Teixo um precursor da síntese, a 10-deacetilbaccatina III,

e a ela adicionando uma cadeia lateral (PANDEY, 1998; WANI *et al.*, 1971; KINGSTON, 2000).

O PTX tem fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$, massa molar de 853,9 g/mol, apresenta baixa solubilidade em água ($< 0,1 \mu\text{g/ml}$) e contém um anel taxano como núcleo, sendo o primeiro dos taxanos a ser testado em ensaios clínicos e a ser aceito pelo *Food and Drug Administration* (FDA). O paclitaxel é amplamente utilizado para tratamento de vários tipos de tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, ovário, pulmão, cabeça, pescoço e leucemias agudas (SPENCER & FAULDS, 1994; MALIK *et al.*, 2011; ALQAHTANI, 2019; SHARMA *et al.*, 2014).

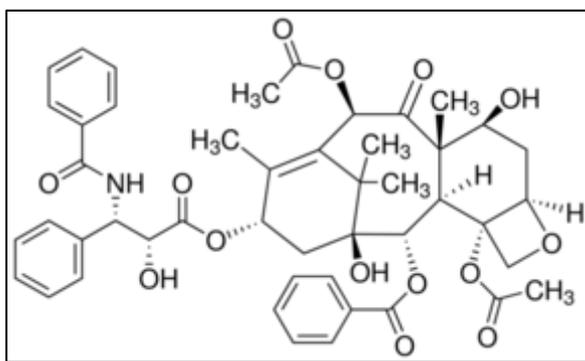


Figura 2 - Estrutura química do paclitaxel

A fim de contornar o problema da baixa solubilidade em água, as formulações comerciais de PTX são compostas por óleo de rícino poliexilado (Cremophor®) e etanol (1:1). A quantidade necessária desse veículo para administrar as doses requeridas de PTX é significativamente alta e vários efeitos colaterais estão associados ao Cremophor®, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade e hipersensibilidade (GELDERBLOM *et al.*, 2001; CHIANG *et al.*, 2014). Além disso, o veículo altera o perfil farmacocinético do PTX (MARUPUDI *et al.*, 2007; SPARREBOOM *et al.*, 1996; VAN TELLINGEN *et al.*, 1999). Desta forma, diversos estudos vêm sendo realizados para desenvolver novas formulações na ausência do Cremophor® e que

sejam tão eficazes quanto a formulação convencional (IBRAHIM *et al.*, 2002; MICHA *et al.*, 2006; NYMAN *et al.*, 2005).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BSC), que classifica os fármacos levando em consideração a solubilidade aquosa e a permeabilidade intestinal, o PTX é um fármaco pertencente à classe IV, uma vez que apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Como o PTX apresenta baixíssima biodisponibilidade oral, o medicamento é de difícil administração por via oral (AMIDON *et al.*, 1995; STEVENS *et al.*, 2014; CHIANG *et al.*, 2014). A dose de PTX considerada aceitável está entre 5,4 e 12 mg/kg, sendo 7 mg/kg a dose administrada por infusão por 3 horas e 5,4 mg/kg por 24 horas, ambos a cada 3 semanas (ROWINSKY *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2019).

O mecanismo de ação do PTX se distingue da maioria dos agentes citotóxicos, uma vez que não interage diretamente com os componentes nucleares (DNA e RNA), mas age na fase mitótica, impedindo a progressão normal do ciclo celular e levando à morte celular por apoptose, que consiste na autodestruição celular ordenada com uma finalidade biológica definida e que demanda certo gasto energético. Por isso, o PTX é designado como agente anti-mitótico ou inibidor da divisão celular (ZHANG *et al.*, 2013; HUIZING *et al.*, 1995). Dessa forma, o PTX é extremamente prejudicial às células tumorais, que estão em processo de divisão celular descontrolada.

Apesar de ser uma droga eficiente e utilizada tanto como primeira quanto segunda linha de tratamento, o PTX apresenta inúmeros efeitos adversos que comprometem os mais variados sistemas e órgãos. Por esta razão, o encapsulamento e a vetorização das nanopartículas que contêm o fármaco mostra-se como uma vantajosa alternativa em relação à administração clássica do PTX, visando a superar o problema de solubilidade, controlar a liberação no tempo, atingir somente células alvo do fármaco e reduzir a toxicidade em relação às células normais.

SILVESTRI e colaboradores (2009) estudaram o encapsulamento de PTX em filmes de poli[(metacrilato de metila)-co-(2-hidróxi-etil metacrilato)] (P(MMA-co-HEMA))

por evaporação de solvente, de modo a promover a liberação controlada. Os ensaios de liberação mostraram uma liberação de, aproximadamente, 0,04 µg/mg (em relação ao solvente) em filme de PMMA puro, 0,3 µg/mg (em relação ao solvente) em filme de P(MMA-co-HEMA) com 18% em massa do monômero HEMA e 0,56 µg/mg (em relação ao solvente) em filme de P(MMA-co-HEMA) com 27% em massa do monômero HEMA, no período de 24 dias. O estudo mostrou que o aumento na quantidade do monômero HEMA melhorou as propriedades hidrofílicas do polímero, modificando o mecanismo de eluição do PTX pela matriz polimérica.

RAJAE e FARZI (2015) utilizaram a polimerização em miniemulsão para o encapsulamento *in situ* de PTX em PMMA, poliestireno (PS) e poli(metacrilato de metil-co-estireno-co-ácido acrílico) (P(MMA-co-St-co-AA)). Os resultados mostraram que quanto maior a porcentagem de estireno no polímero maior a liberação do fármaco, em testes de 96 h.

2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A nanotecnologia é o ramo da ciência que engloba a pesquisa, desenvolvimento e inovação em sistemas que envolvem estruturas e dispositivos de dimensões nanométricas (0,1 a 100 nm) (BARRIOS, 2010). Nas últimas décadas, diversos estudos vêm sendo realizados em função das diferentes características (comportamento e/ou propriedades) que os sistemas podem apresentar por conta do pequeno tamanho destas partículas, diferentes daquelas apresentadas por materiais na escala macroscópica (BARRIOS, 2010; DURÁN, *et al.*, 2006).

As nanotecnologias apresentam potenciais aplicações nas áreas de diagnóstico e terapia, sendo que a vetorização de moléculas em nanocarreadores pode levar a inúmeras vantagens frente aos sistemas convencionais, como a capacidade de atravessar barreiras biológicas (barreira hematoencefálica, por exemplo), a modulação

da distribuição do fármaco, a diminuição da toxicidade (promissor para terapia do câncer, entre outras), o aumento do tempo de circulação no organismo de substâncias lábeis ou rapidamente eliminados (como proteínas e peptídeos), a veiculação de fármacos hidrofóbicos, promovendo sua solubilização, dentre muitas outras (KREUTER, 2007). Existem diversos tipos de nanocarreadores, como esquematizado na Figura 3, incluindo os nanotubos, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), nanoesferas, nanocápsulas, micelas poliméricas e dendrímeros (RAWAT *et al.*, 2006).

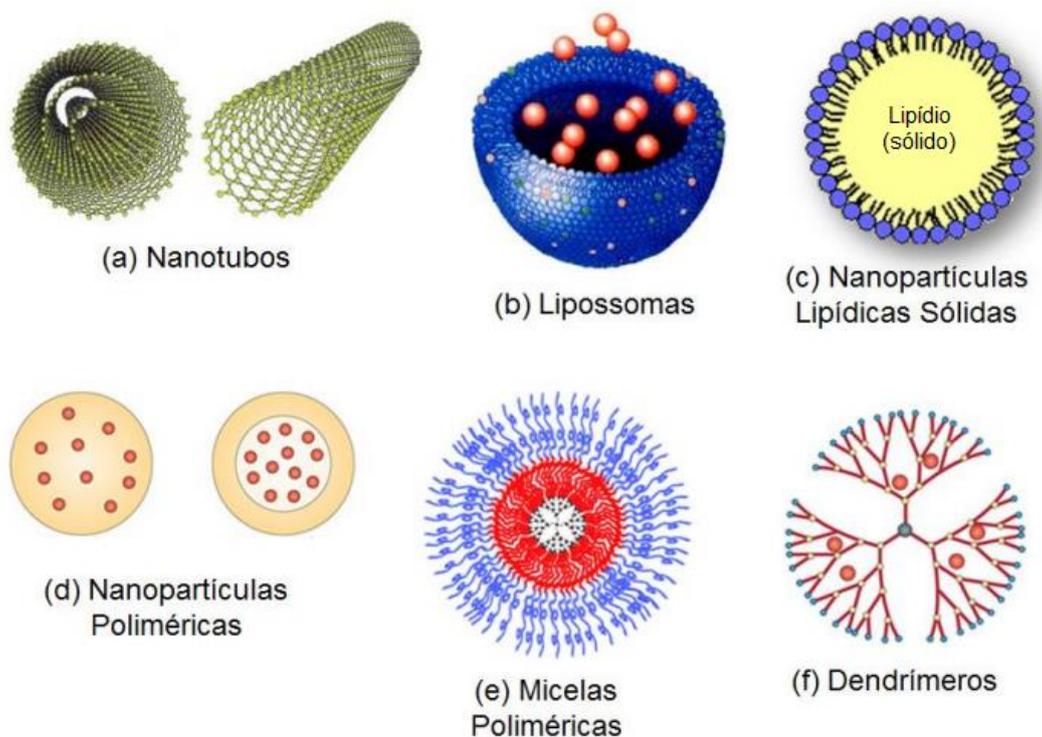


Figura 3 - Principais tipos de nanocarreadores (adaptada de RAWAT *et al.*, 2006).

As nanopartículas poliméricas constituem potenciais sistemas de liberação de ativos. Essas nanopartículas podem ser definidas como sistemas coloidais ou carreadores sólidos de fármacos, com diâmetros inferiores a 1 μm , produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou não, sendo o produto da biodegradação biocompatível, toxicologicamente seguro e eliminado pelas vias metabólicas normais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GHARIEH *et al.*, 2019).

Encontram-se na literatura diversas classificações baseadas no tamanho dos sistemas nanoparticulados. Partículas que apresentam duas ou três dimensões entre 1 nm e 100 nm são usualmente consideradas como nanopartículas, de acordo com a ASTM (2012). Entretanto, de acordo com a União Europeia, para fins farmacêuticos, ainda podem ser classificadas como nanopartículas, os sistemas com tamanho menor que 1000 nm e que sejam biologicamente ativos ou que tenham a capacidade de veicular fármacos (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

A literatura apresenta várias técnicas para o preparo de nanopartículas poliméricas. A organização estrutural pode variar de acordo com o método utilizado. O fármaco pode ser retido na matriz polimérica, encapsulado em um núcleo, estar quimicamente conjugado ao polímero ou adsorvido sobre a superfície da partícula. Assim, são classificadas genericamente duas organizações principais: as nanocápsulas e as nanoesferas, como mostrado na Figura 4.

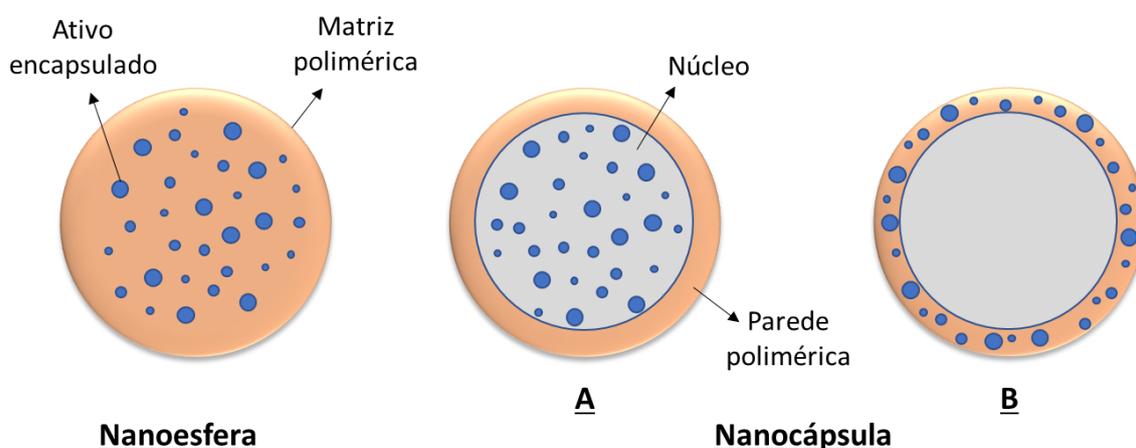


Figura 4 – Representação esquemática das nanoesferas e nanocápsulas poliméricas (ativo dissolvido no núcleo (A) ou adsorvido na parede polimérica (B)).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares, formados normalmente por núcleo aquoso ou oleoso, envolvidos por revestimento polimérico, onde as substâncias ativas encontram-se normalmente dissolvidas, embora também possam estar adsorvidas sobre a superfície. Desta forma, a substância encapsulada encontra-se envolvida por

uma membrana, geralmente polimérica, que isola o núcleo do meio externo. As nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica contínua, em que o fármaco pode estar disperso ou adsorvido. Neste caso, obtém-se um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, SOPPIMATH, 2001; RAO E GECKELER, 2011; AULTON, 2005).

Nos últimos anos, os materiais poliméricos vêm sendo cada vez mais utilizados, em função da versatilidade estrutural com que podem ser fabricados e que permite que sejam utilizados em aplicações farmacêuticas, biotecnológicas e médicas diferenciadas. Ao que se refere ao sistemas de liberação controlada, os materiais poliméricos se destacam, pois os ativos podem ser liberados lentamente pelo processo de difusão ou de decomposição parcial, permitem a presença de outros componentes que podem atuar, por exemplo, no controle da taxa de liberação de fármaco e ainda permitem que a liberação do fármaco ocorra em locais específicos (PICHOT, 2004; KAWAGUCHI, 2000; GHARIEH *et al.*, 2019).

Ainda hoje, a necessidade da biodegradabilidade dos polímeros utilizados em aplicações biomédicas é discutida. Polímeros biodegradáveis são aqueles que sofrem degradação macromolecular *in vivo*, por ação de enzimas, micro-organismo ou células, formando produtos que podem ser facilmente eliminados pelo rim. A escolha de um polímero biodegradável para fins biomédicos está relacionada ao fato de que os produtos da biodegradação não sejam tóxicos e que a taxa de degradação corresponda à aplicação final pretendida (NAIR e LAURENCIN, 2006; PAIVA, 2019). Em contrapartida, em alguns casos a biodegradabilidade passa a não ser interessante quando se deseja que o sistema de entrega permaneça no organismo por mais tempo. Além disso, acredita-se que polímeros não-biodegradáveis utilizados em sistemas de liberação promovam uma liberação mais controlada e por maiores períodos de tempo (HOLZAPFEL *et al.*, 2005; OKABE *et al.*, 2003). 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 comum em outros sistemas; por isso, podem apresentar cinética de liberação mais bem controlada (FU e KAO, 2010).

Particularmente, o poli(metacrilato de metila) (PMMA) (Figura 5) é um polímero sintético obtido a partir da polimerização por adição do monômero metacrilato de metila, que apresenta boas propriedades mecânicas, fácil manuseio e processamento, alto brilho, boa resistência química, boas propriedades térmicas e baixo custo. Além disso, o PMMA é amplamente utilizado em aplicações biomédicas, como por exemplo como cimentos ósseos e dentais, no revestimento de formulações para administração oral e no desenvolvimento de implantes permanentes para lentes intra-oculares (CASTOR JR. *et al.*, 2019; MARK, 2002; FEUSER *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2012; BETTENCOURT e ALMEIDA, 2012; SHASTRI, 2003; GRAÇA *et al.*, 2017).

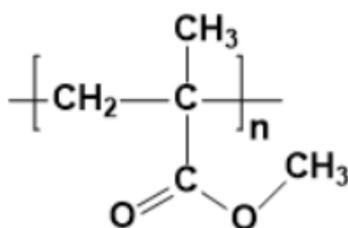


Figura 5 - Fórmula estrutural do poli(metacrilato de metila).

Partículas de PMMA têm sido amplamente estudadas para a entrega dos mais variados fármacos, tanto por via oral como local, tendo capacidade tanto para estabilizar fármacos instáveis, como os antioxidantes, quanto para solubilizar fármacos poucos solúveis (BETTENCOURT e ALMEIDA, 2012). SIVAKUMAR e RAO (2002) avaliaram o encapsulamento do anti-inflamatório ibuprofeno, que é um fármaco pouco solúvel, em PMMA, com e sem grupos funcionais carboxílicos, via técnica de evaporação de solvente. YUKSEL *et al.* (2011) propuseram o encapsulamento do anti-inflamatório indometacina em PMMA, também a partir do método de evaporação de solvente, visando a obter um perfil de liberação prolongado ao longo de um período de 24 horas.

A utilização de polímeros para o transporte de fármacos apresenta, frente à administração convencional, muitas vantagens competitivas, uma vez que a modificação da superfície das partículas poliméricas pode atrasar ou impedir o reconhecimento pelo sistema retículo-endotelial (RES), evitando a rápida eliminação da circulação sanguínea (SEYMOUR *et al.*, 1987). Adicionalmente, fármacos encapsulados em polímeros apresentam desempenho reconhecidamente superior em relação aos fármacos livres durante o tratamento de tumores sólidos, devido ao efeito EPR, que leva ao acúmulo preferencial do polímero no tumor, enquanto o sistema linfático é ineficiente em torno das células tumorais e dificulta a eliminação do carreador do fármaco (MATSUMURA e MAEDA, 1986).

Nestes sistemas, os fármacos são liberados por meio de mecanismos que podem envolver a dessorção do composto ativo, difusão através da matriz ou parede polimérica, desintegração, dissolução ou erosão do polímero. Assim, solubilidade, difusão e biodegradação da matriz da partícula governam os processos de liberação (SONAJE *et al.*, 2007; MORAES, 2009; AULTON, 2005).

As nanopartículas podem ser produzidas sob medida para realizar a liberação controlada do fármaco, assim como para alcançar a localização específica do sítio da patologia, por meio do ajuste das características do polímero e da química da superfície (NAKACHE *et al.*, 2000; SOUNDERYA & ZHANG, 2008; SINGH & LILLARD, 2009; LEE *et al.*, 2014; BENNET & KIM, 2014).

2.4 NANOENCAPSULAMENTO

O modo de preparo das nanopartículas desempenha um papel crucial no alcance das propriedades de interesse, dependendo de cada tipo de aplicação, do material ativo a ser encapsulado e do mecanismo de liberação desejado. De um modo geral, podem ser utilizados dois métodos para o preparo das nanopartículas poliméricas: a precipitação do polímero pré-formado e dissolvido em um solvente apropriado e a

polimerização a partir de monômeros (polimerização *in situ*). Na área farmacêutica, comumente utilizam-se polímeros prontos, sendo as técnicas mais usadas a de evaporação do solvente ou secagem por aspersão (*spray drying*) (SAWALHA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2014; SUAVE *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria das técnicas que trabalha com os polímeros pré-formados requer o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos na etapa de dissolução do material, introduzindo riscos por causa da potencial toxicidade, além de requerer uma etapa extra de processamento para a retirada do solvente residual do produto e reciclagem do solvente, aumentando significativamente os custos do processo (THICKETT e GILBERT, 2007; SOUTO *et al.*, 2012; GORINI *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2005).

Entretanto, as nanopartículas também podem ser produzidas pela técnica de polimerização *in situ*, em que o encapsulamento é realizado em uma única etapa, no decorrer do próprio processo de polimerização, uma vez que os ativos são incorporados diretamente às gotas de monômero. Dessa forma, além da facilidade da incorporação, essa técnica permite que seja encapsulada uma maior carga do ativo no sistema polimérico e a obtenção de polímeros com comprimentos de cadeia e massas molares desejadas e projetadas especialmente para o sistema de administração de fármacos (NGWULUKA, 2010; PAIVA, 2019).

Os métodos de polimerização de monômeros para síntese das nanopartículas poliméricas mais explorados são as polimerizações em emulsão e em miniemulsão. (THICKETT e GILBERT, 2007; SOUTO *et al.*, 2012). Independentemente do método escolhido, o produto obtido deve apresentar algumas características, como a manutenção da estabilidade e atividade do fármaco, alta eficiência de encapsulamento, baixo índice de polidispersão de tamanho das nanopartículas e de massas molares do polímero e cinética de liberação do fármaco reprodutível entre as bateladas (MOREIRA, 2015).

2.4.1 Polimerização em emulsão e miniemulsão

Os sistemas em emulsão do tipo óleo em água (O/A) mais comuns são caracterizados por apresentarem uma fase contínua polar, geralmente a água, e uma fase dispersa que contém um ou mais monômeros. No sistema inverso (A/O), a fase aquosa encontra-se dispersa na forma de gotas na fase contínua oleosa, conforme apresentado na Figura 6 (LENZI *et al.*, 2004; ARAÚJO, 1999; CHERN, 2006, MCCLEMENTS *et al.*, 2012). Independentemente do sistema, surfactantes devem ser utilizados para diminuir a tensão interfacial entre as fases dispersa e contínua, fazendo com que a estabilidade do sistema aumente e a emulsão possa ser formada (HERK, 2008; OLIVEIRA, 2013). Sendo assim, a polimerização em emulsão é um processo heterogêneo de reação, em que os monômeros são polimerizados quase sempre por radicais livres oriundos da decomposição de um iniciador solúvel na fase contínua ou dispersa (THICKETT e GILBERT, 2007).

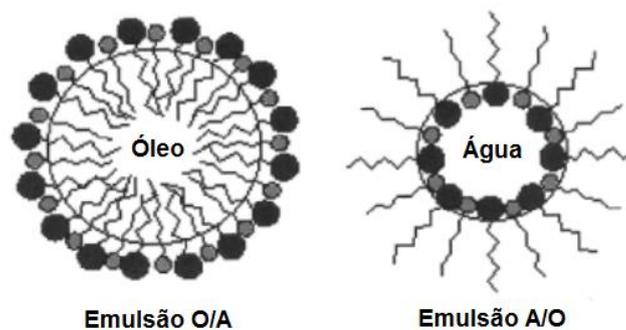


Figura 6 - Estrutura das emulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) (adaptada de OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As principais vantagens dos processos de polimerização em emulsão são a possibilidade de obter polímero de elevadas massas molares e com elevadas taxas de reação simultaneamente, devido à natureza compartimentalizada destes sistemas. Ressalta-se também a facilidade de transferência de calor, devido à natureza heterogênea do meio e à utilização de água como fase contínua. Além disso, a técnica

permite melhor adequação a normas ambientais, devido à ausência de solventes, e permite o uso do produto final diretamente na forma de látex, dispensando etapa de separação. Finalmente, é possível sintetizar polímeros com diferentes características, como composição e grau de cristalinidade, e com diferentes propriedades coloidais, como morfologia e distribuição de tamanhos de partículas (ARAUJO, 2001; THICKETT e GILBERT, 2007).

Os sistemas em emulsão podem ser divididos genericamente em emulsão convencional e miniemulsão, que geram ao final do processo de polimerização partículas com tamanhos característicos, definidos principalmente pelo mecanismo da formação das gotas de monômero e partículas de polímero (OLIVEIRA, 2013; ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002).

As emulsões convencionais são conhecidas apenas como emulsões poliméricas. Nestes sistemas, o processo de emulsificação gera inicialmente gotas de monômero de tamanho micrométrico, estabilizadas por surfactantes, que funcionam como reservatórios de monômero do sistema. Como o surfactante encontra-se acima da concentração micelar crítica (CMC), ocorre a formação de micelas. Em geral, as gotas de monômero não são eficazes para competir com as micelas na captura de radicais livres gerados por um iniciador adicionado à fase aquosa, já que a área específica da interface das gotas de monômeros com a água é relativamente pequena, enquanto as micelas apresentam área interfacial água-óleo muito elevada. Os radicais livres produzidos na fase aquosa polimerizam primeiramente as moléculas de monômero dissolvidas na fase aquosa. À medida que o radical se propaga, a hidrofobicidade da cadeia aumenta. Quando um grau de polimerização crítico é alcançado, os radicais oligoméricos presentes na fase aquosa apresentam forte tendência para precipitar, agregar ou entrar nas micelas, onde continuam a propagar, reagindo com as moléculas de monômero presente nas micelas inchadas com a fase orgânica. Dessa forma, as micelas, ao serem nucleadas pelos radicais, tornam-se partículas de polímero, onde a polimerização prossegue. À medida que a reação vai

consumindo o monômero presente nas micelas, mais monômero é fornecido por difusão das gotas e através da fase aquosa. A etapa de nucleação das partículas termina imediatamente após o esgotamento das micelas (Fase I) (ARAÚJO, 1999; ASUA, 2002; CHERN, 2006). Cerca de uma em cada $10^2 - 10^3$ micelas pode ser convertida com êxito em partícula de látex, com tamanho médio das partículas normalmente maiores que 100 nm (CHERN, 2006; ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002).

Ao findar o processo de nucleação (Fase I), o número de partículas de látex por unidade de volume de água permanece relativamente constante até o fim da polimerização. A reação de propagação dos radicais livres com as moléculas de monômero ocorre principalmente nas partículas poliméricas inchadas com monômero. As gotas de monômero servem apenas como reservatórios para alimentar as partículas em crescimento com monômero e surfactante. O estágio de crescimento da partícula (Fase II) acaba quando as gotas de monômero desaparecem no sistema de polimerização. A concentração de monômero nas partículas não varia durante o progresso da polimerização na Fase II na presença de gotas de monômeros. Como resultado, uma taxa de polimerização essencialmente constante é atingida durante a Fase II (ARAÚJO, 1999; ASUA, 2002; CHERN, 2006).

As partículas de látex tendem a consumir todo monômero disponível no local da reação, levando à diminuição até o fim da polimerização (Fase III). Como consequência, a taxa de polimerização não pode ser mantida, tendendo a decrescer durante a Fase III (ARAÚJO, 1999; ASUA, 2002; CHERN, 2006). Um esquema ilustrativo da evolução da taxa de reação na polimerização em emulsão convencional é apresentado na Figura 7.



Figura 7 - Representação esquemática da taxa de polimerização como função da conversão do monômero para polimerização em emulsão (CHERN *et al.*, 2006).

A polimerização em miniemulsão apresenta um mecanismo completamente diferente de formação das partículas poliméricas. Neste sistema, a concentração de surfactante encontra-se abaixo da CMC, levando à ausência de micelas. Desta forma, a reação de polimerização ocorre dentro das gotas de monômero, que funcionam como “nano-reatores”. A polimerização se processa de forma isolada em cada gota, não ocorrendo difusão de monômero através da fase aquosa. Por isso, o látex obtido é basicamente uma “cópia” das gotas originalmente formadas no processo de emulsificação original. Além disso, a polimerização em miniemulsão se caracteriza pela formação de partículas na faixa de 50-500 nm e com distribuição de tamanhos bastante homogênea. Nestes sistemas, as taxas de reação variam continuamente ao longo do tempo de reação, sendo que o iniciador pode ser adicionado na fase orgânica ou aquosa (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002; LANDFESTER, 2001; CAPEK, 2010).

A miniemulsão é um tipo especial de emulsão, que inicialmente forma sistemas termodinamicamente instáveis, sendo necessário o uso de uma força de cisalhamento de alta energia para a formação das pequenas gotas de monômero estáveis cineticamente. Os equipamentos normalmente empregados para dispersão das

miniemulsões são o ultra-turrax (rotor-estator), o sonicador e o homogeneizador de alta pressão (SCHORK *et al.*, 2005; ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; LOPEZ *et al.*, 2008).

O ultra-turrax é um equipamento que induz o forte cisalhamento por meio da rotação em alta velocidade de um rotor em relação a um estator fixo. O tamanho das gotículas formadas depende da geometria do equipamento e da velocidade de rotação, que determinam a intensidade de cisalhamento gerada. O ultra-turrax não permite obter uma distribuição de tamanhos de gotícula muito homogênea, uma vez que as partículas obtidas apresentam uma ampla faixa de tamanhos (ASUA, 2002; LOPEZ *et al.*, 2008).

O sonicador gera ondas de ultrassom que causam oscilações das moléculas de fluido nas proximidades do local de propagação das ondas. Preferencialmente, o sistema deve ser mantido agitado, para garantir que todo o fluido passe na região de sonificação e para que ocorra a quebra de todas as gotas de monômero. Dessa forma, o tempo e a potência de sonificação são fundamentais no processo de preparação da miniemulsão (ASUA, 2002).

O homogeneizador de alta pressão envolve a pressurização de dispersões por uma bomba com deslocamento positivo e posterior passagem da dispersão através de uma abertura estreita a altas velocidades. O processo gera elevados gradientes de velocidade e de tensão de cisalhamento, que promovem uma dispersão fina da mistura. A posição da válvula de abertura pode ser controlada por diferentes dispositivos de pressão e o líquido emulsionado pode recircular várias vezes através do homogeneizador. Quanto maior é o número de ciclos, menor é o tamanho médio das gotículas (QUAN *et al.*, 2011).

Além do surfactante, a estabilidade das gotículas é assegurada pela adição de um coestabilizante ou agente de pressão osmótica, que apresenta baixa solubilidade na fase contínua e garante uma barreira de difusão do monômero para o meio aquoso, o que dificulta a separação das fases e o transporte de massa das menores partículas para as maiores (degradação difusional) (LANDFESTER, 2009). É importante ressaltar

que o coestabilizante deve apresentar baixa massa molar, para que a razão entre o número de mols de coestabilizante e o número de mols de monômero seja suficientemente alta, aumentando a pressão osmótica. Os coestabilizantes mais utilizados são o hexadecano e o álcool cetílico; porém, alguns compostos hidrofóbicos (como polímeros) também podem ser usados para este fim (SCHORK *et al.*, 2005; LIM & CHEN, 2000).

Uma característica vantajosa dos sistemas em miniemulsão é a possibilidade de que a geração de radicais ocorra diretamente no interior da gota monomérica. Uma vez que iniciadores químicos são largamente utilizados para gerar radicais livres nesses sistemas, pode ser feita a escolha por iniciadores solúveis no monômero. Dessa forma, quando a fase dispersa é emulsificada, garante-se que todas as gotas sejam nucleadas, pois teoricamente todas as gotas contam com uma fração de iniciador dissolvida em seu interior (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os processos de polimerização em miniemulsão permitem ainda que ativos sejam incorporados diretamente às gotas de monômero. Tal técnica é chamada de incorporação *in situ* e permite trabalhar com grandes quantidades de ativo. Na polimerização em emulsão convencional, a incorporação de um ativo requer o inchamento das micelas, o que é muito mais complexo (PAIVA, 2015). A Figura 8 apresenta um esquema genérico para o processo de polimerização em miniemulsão.

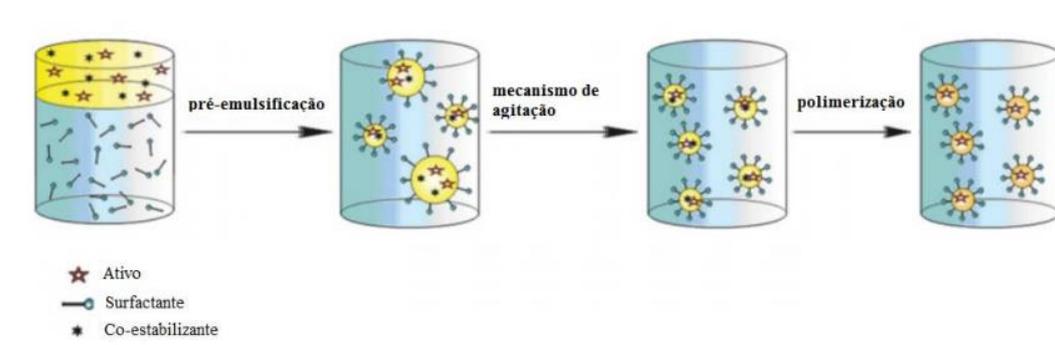


Figura 8 - Representação esquemática da polimerização em miniemulsão (adaptada de LANDFESTER, 2001).

Dois mecanismos de nucleação diferentes podem ocorrer durante a polimerização em miniemulsão: nucleação das gotas, preferível e mais comum, e nucleação homogênea. No primeiro, a nucleação é iniciada diretamente por radicais que entram ou encontram-se nas gotículas de monômero, promovendo a produção de partículas com distribuição de tamanhos relativamente uniforme. No segundo mecanismo possível, a polimerização ocorre inicialmente na fase aquosa, dando origem a oligômeros que podem crescer até um comprimento crítico que os torna insolúveis na água, resultando na precipitação. Esta forma de nucleação deve ser normalmente evitada, pois leva a distribuições de tamanho de partículas heterogêneas (ZIEGLER *et al.*, 2009; ASUA, 2002).

De forma resumida, para que um sistema seja considerado como uma miniemulsão polimérica, devem ser observadas algumas características (CAPEK, 2010; ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002; LANDFESTER *et al.*, 2000):

- O emprego de altas energias de cisalhamento é necessário para a formação da miniemulsão, fazendo com que o tamanho final das gotas seja definido por um processo dinâmico de coalescência e cisão das gotas, direcionando o sistema disperso a um estado de equilíbrio dinâmico;
- O uso de um surfactante e de um coestabilizante garante a estabilidade cinética das gotas após o processo de cisalhamento. A presença do coestabilizante nas nanogotas diminui significativamente a degradação difusional (*Ostwald ripening*), criando uma pressão osmótica que contrapõe a pressão de Laplace nas gotas menores;
- A formação de micelas e o mecanismo de nucleação micelar devem ser evitados nos sistemas de miniemulsão para evitar a formação adicional de partículas. Assim, a quantidade de surfactante encontra-se abaixo da CMC, levando à cobertura quase sempre incompleta das gotas pelo surfactante, o que pode ser relevante para caracterizar a estabilidade desses sistemas;

- O tamanho final das gotas é diretamente proporcional à concentração de surfactante. Quanto maior é a concentração de surfactante no meio, menor é o tamanho das gotas e maior é o grau de cobertura com surfactante;
- Nos sistemas em miniemulsão, a polimerização pode ser iniciada por iniciadores químicos solúveis na fase contínua, levando a um início de polimerização semelhante ao da emulsão convencional, evitando a nucleação homogênea na fase dispersa ou na interface do sistema. Entretanto, o controle da reação em alguns casos é favorecido quando a geração dos radicais ocorre apenas na fase contínua, uma vez que alguns tipos de iniciadores apresentam mecanismos complexos de partição entre as diferentes fases da miniemulsão, levando a controle menos preciso das condições de reação.

2.5 POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAIS LIVRES

Uma imensa gama de polímeros pode ser sintetizada a partir das técnicas de polimerização via radicais livres. Essas técnicas podem ser usadas com larga gama de monômeros, já tendo sido adaptadas a diversos sistemas de polimerização, com menor custo, mais fácil adequação, menor sensibilidade a impurezas e água e com possível operação em diversas condições reacionais, quando comparadas a outros métodos de polimerização. Cerca de 50% de todos os polímeros comerciais no mundo são obtidos pelo processo de polimerização via radicais livres (ODIAN, 2004; COSTA *et al.*, 2000; ZETTERLUND *et al.*, 2008).

Os mecanismos cinéticos das reações de polimerização via radicais livres, independentemente do sistema de polimerização ou dos reagentes químicos usados, apresentam ao menos três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MANO, 1999; CANEVAROLO, 2006).

- i) **Iniciação:** na etapa de iniciação são gerados os centros ativos; no caso dessas reações, os radicais livres. Estes radicais livres ($R\bullet$) são formados pela cisão homolítica de uma ligação covalente fraca na molécula do iniciador (I) (Equação 1). A espécie ativa formada reage com o monômero (M), dando origem a um radical livre monomérico que inicia a polimerização ($P_1\bullet$) (Equação 2). Eventualmente, a geração dos radicais livres pode ser espontânea a partir do monômero, sem a presença de espécie iniciadora.

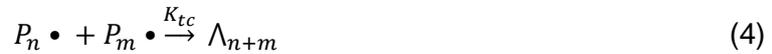


- ii) **Propagação:** nesta etapa ocorre o crescimento da cadeia polimérica, uma vez que as unidades monoméricas são incorporadas às espécies ativas (ou vivas) formadas na iniciação de forma sequencial, em um processo de reação em cadeia (Equação 3).



- iii) **Terminação:** a interrupção do crescimento da cadeia ocorre com a perda de atividade do centro ativo, formando uma cadeia de polímero inativa (ou morta). A etapa de terminação ocorre tipicamente por dois modos: combinação e desproporcionamento. A terminação por combinação ocorre por conta da união dos centros ativos de duas cadeias vivas, dando origem a uma ligação covalente entre os elétrons desemparelhados, formando uma única cadeia (Equação 4). Na terminação por desproporcionamento, a reação de propagação é interrompida quando um radical captura um átomo de hidrogênio de uma outra

cadeia ativa, formando uma ligação C-H numa extremidade e criando uma ligação insaturada C=C na extremidade da outra cadeia (Equação 5).



As polimerizações via radicais livres apresentam como característica intrínseca o fato das cadeias em crescimento apresentarem a tendência de sofrerem terminação prematura, levando à formação de cadeias com tamanhos bastante heterogêneos, dificultando o bom controle da massa molar e ocasionando altos índices de polidispersão ($M_w/M_n > 1,5$) (ALLCOCK & LAMPE, 1990; MOAD *et al.*, 2005). Isto se deve ao fato de que, durante a polimerização, radicais são continuamente formados, enquanto cadeias propagam e são terminadas irreversivelmente e simultaneamente pela reação radical-radical. Isso faz com que o tempo de vida de um radical seja da ordem de frações de segundos, enquanto a duração dos processos típicos de polimerização é da ordem de horas (SAVE *et al.*, 2006; MOAD *et al.*, 2005). Desta forma, não é possível realizar um controle adequado da formação de cadeias poliméricas e sintetizar polímeros com arquitetura complexa, como por exemplo polímeros em bloco, e/ou polímeros com baixo índice de polidispersão ($M_w/M_n < 1,3$), afetando também as propriedades químicas e mecânicas dos materiais produzidos (ODIAN, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2013, VOSLOO *et al.*, 2002).

Buscando superar as limitações da polimerização radicalar convencional, uma nova classe de técnicas de polimerização surgiu nos últimos anos, permitindo sintetizar polímeros com arquitetura molecular complexa, conhecidas como polimerizações radicalares vivas ou controladas (*Controlled/Living Radical Polymerization*, CLRP) (ZETTERLUND *et al.*, 2005).

2.6 POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE VIVA OU CONTROLADA

As CLRP são técnicas versáteis e robustas, que permitem sintetizar polímeros com arquitetura molecular definida, utilizando monômeros e condições reacionais convencionais (BOYER *et al.*, 2009). As reações do tipo CLRP, que ocorrem via mecanismo de radicais livres, apresentam características típicas de uma polimerização viva: etapas de reação que ocasionam a morte da espécie propagante são mantidas em níveis reduzidos. Nessas reações, os radicais propagantes são convertidos em espécies dormentes, reduzindo a probabilidade de terminação (VOSLOO *et al.*, 2002; BAUM & BRITTAİN, 2002; BOYER *et al.*, 2009). Embora as CLRP permitam executar bom controle da estrutura molecular do polímero sintetizado, essas técnicas não são de fato reações vivas, uma vez que as reações de terminação não são de fato totalmente suprimidas, justificando o uso do termo 'controlado' (BOYER *et al.*, 2009; ZETTERLUND *et al.*, 2008).

Como citado anteriormente, as técnicas de CLRP ocorrem via mecanismo de radicais livres, apresentando normalmente as três etapas cinéticas características: iniciação, propagação e terminação. O que difere a técnica de CLRP da polimerização via radicais livres convencional é a etapa de propagação, uma vez que as cadeias em crescimento são reversivelmente desativadas, ocasionando o crescimento das cadeias somente quando em estado ativo, como pode ser observado genericamente na Figura 9 (MOAD *et al.*, 2005, ZETTERLUND *et al.*, 2008).

Existem diversas técnicas de CLRP, sendo que as mais conhecidas e pesquisadas são a Polimerização Mediada por Nitróxido (*Nitroxide Mediated Polymerization*, NMP), a Polimerização Radicalar por Transferência de Átomos (*Atom Transfer Radical Polymerization*, ATRP) e a Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*, RAFT) (GEORGES *et al.*, 1993; DAVIS & MATYJASZEWSKI, 2004; QIU *et al.*, 2001; CUNNINGHAN *et al.*, 2002; MOAD, 2005; ZETTERLUND *et al.*, 2008).

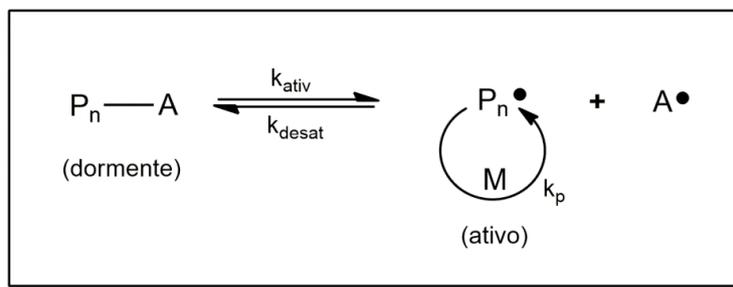


Figura 9 - Representação esquemática da reação de sistemas de CLRP, em que “A” representa o agente de transferência de cadeia (CTA) (adaptada de ZETTERLUND *et al.*, 2008).

A técnica de NMP consiste no uso de radicais estáveis de nitrogênio como agentes controladores. Estes compostos, dentre os quais o mais usado é o TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxila), reagem reversivelmente com outras espécies radicalares. O iniciador neste caso pode ser um monômero funcionalizado com nitróxido que, ao clivar-se, forma o monômero radical e o nitróxido controlador. Uma das principais desvantagens da técnica de NMP é a necessidade do uso de altas temperaturas para que a espécie não radicalar termolábil produza os radicais que se polimerizam. Essa desvantagem impede o uso de solventes que apresentam baixa temperatura de ebulição à pressão ambiente (SOLOMON, 2005).

Na técnica de ATRP, compostos de coordenação de metais de transição são usados como agentes controladores. Estes compostos reagem com haletos orgânicos (monômero-iniciador), gerando então uma espécie radicalar, o metal de transição com um elétron desemparelhado e um ânion do haleto. Porém, o equilíbrio está sempre deslocado no sentido inverso, de tal forma que existe uma baixa concentração de radicais na solução, prevenindo o processo de terminação. Dentre as principais desvantagens da ATRP, destaca-se a contaminação do meio reacional com metais de transição (cobre e ferro, por exemplo), o que pode gerar a necessidade de purificação adicional, particularmente em aplicações médicas e farmacêuticas. A polimerização é sensível ao oxigênio e, via de regra, tem que ser realizada em solução orgânica (MATYJASZEWSKI, 2002).

Dentre as técnicas de CLRP, a polimerização RAFT é considerada uma das mais versáteis, podendo ser combinada com diversos sistemas, monômeros e condições reacionais, produzindo polímeros com distribuições estreitas de massas molares, além de co-polímeros com arquitetura molecular complexa (CHIEFARI *et al.*, 1998; BOYER *et al.*, 2009).

2.6.1 Polimerização RAFT

As técnicas de polimerização RAFT e a técnica de polimerização MADIX (*Macromolecular Design via the Interchange of Xanthates*) foram reportadas na literatura científica quase que simultaneamente. Além disso, ambas utilizam o mesmo tipo de mecanismo químico, sendo diferenciadas apenas pelo tipo de CTA utilizado nas reações de polimerização, que geralmente são reportados apenas como agentes RAFT (BOYER *et al.*, 2009). A técnica de polimerização RAFT é considerada a mais versátil técnica de CLRP que existe, em função da grande variedade de monômeros funcionais que podem ser utilizados, sem haver necessidade de proteção de grupamentos químicos, e da facilidade com que a estrutura funcional pode ser posteriormente conjugada a uma molécula sintética ou biológica (MOAD *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2018).

De acordo com MOAD *et al.* (2005), a polimerização via RAFT pode ser conduzida idealmente pela simples adição de uma quantidade apropriada do agente de transferência de cadeia (CTA) a uma reação de polimerização via radicais livres convencional, mantendo-se os componentes químicos da receita de polimerização (monômero, iniciador e/ou solvente) e as condições operacionais (como temperatura, pressão, pH, entre outros).

Os agentes RAFT utilizados nesta técnica normalmente contêm um grupamento tiocarbonílico, como mostrado na Figura 10, que é reativo a radicais livres e, por isso, facilita a fragmentação das espécies radiculares intermediárias resultantes. Os agentes apresentam um grupo estabilizante (Z) e um grupo de saída (R), que afetam a cinética

e o grau de controle da polimerização. A eficiência de cada agente RAFT utilizado depende de uma série de fatores, como o tipo de monômero que está sendo polimerizado, a capacidade de reiniciação do grupo de saída (R) e a reatividade da dupla ligação entre o enxofre e o carbono, determinada pelo grupo estabilizante (Z) (MOAD *et al.*, 2005; MC CORMICK & LOWE, 2004; AAMER & TEW, 2007).

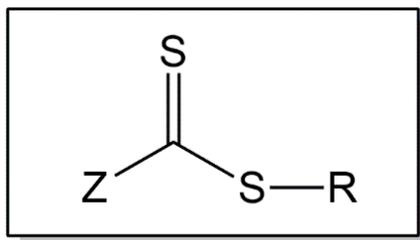


Figura 10 - Representação genérica da estrutura dos agentes de transferência de cadeia RAFT (MOAD *et al.*, 2005).

O mecanismo por meio do qual ocorre a polimerização RAFT geralmente é descrito em cinco etapas, como pode ser observado na Figura 11. Essas etapas compreendem a iniciação, a transferência reversível de cadeia, a re-iniciação, o equilíbrio de cadeia e a terminação (MOAD *et al.*, 2005; MC CORMICK & LOWE, 2004; BOYER *et al.*, 2009; QUINN *et al.*, 2007). A etapa de iniciação ocorre da mesma forma que no mecanismo de polimerização radicalar convencional, em que os radicais livres são gerados e dão início à reação de polimerização. Embora seja possível utilizar diferentes métodos para gerar radicais livres, a decomposição térmica de iniciadores constitui o mecanismo mais adotado para gerar os radicais livres em polimerizações RAFT.

Na etapa de transferência reversível de cadeia, as cadeias em crescimento, oriundas da etapa de iniciação, reagem preferencialmente com as moléculas de agente RAFT presentes no meio reacional, devido à alta reatividade da ligação C=S em relação a qualquer outro tipo de instauração presente no meio reacional. O agente RAFT pode então retornar à configuração inicial ou “liberar” o fragmento R•.

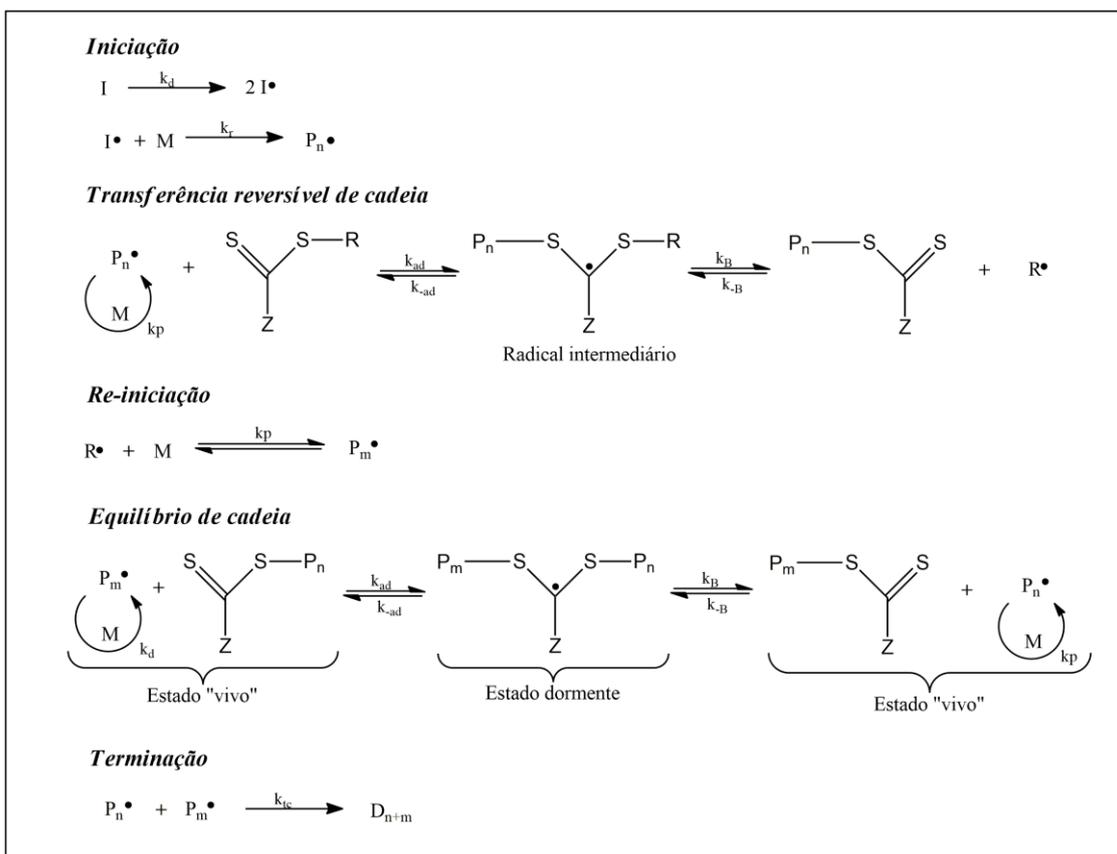


Figura 11 - Mecanismo cinético esquemático de polimerização CLRP do tipo RAFT (MOAD *et al.*, 2005).

Na etapa de re-iniciação ocorre o crescimento da cadeia polimérica por meio de seguidas incorporações de monômero à espécie ativa em crescimento, gerando cadeias de polímero maiores. A principal diferença para a polimerização via radicais livres convencional é que na polimerização RAFT as cadeias em crescimento são iniciadas pelo grupo R. Assim, as cadeias originais geradas pelo iniciador podem ser poucas, garantindo que todas as cadeias tenham a mesma chance de crescer.

Na etapa de equilíbrio de cadeia acontece um equilíbrio dinâmico entre estágios ativos e dormentes das cadeias poliméricas, apenas ocorrendo o crescimento das cadeias quando estas se encontram no estado ativo. O equilíbrio entre as espécies propagantes e os macro-radicaís RAFT é a chave de todo o processo RAFT. As duas constantes de velocidade (k_B e k_{-B}) controlam o equilíbrio. A velocidade de fragmentação deve ser necessariamente mais lenta que a velocidade de adição para garantir que as

espécies dormentes prevaleçam no meio reacional. Dessa forma, a probabilidade de ocorrer reações de terminação entre espécies radicalares é muito baixa.

A última etapa do processo, embora minimizada, é a terminação, quando são geradas cadeias mortas de polímero. Quando a polimerização termina, a maioria das cadeias retém o grupo final do CTA e os polímeros podem ser isolados como materiais estáveis. Sendo assim, esses polímeros podem ser utilizados em novas polimerizações, como macro-radicaís RAFT para formação de copolímeros em bloco, podendo-se obter polímeros com diversas arquiteturas (MOAD *et al.*, 2005; MC CORMICK & LOWE, 2004; BOYER *et al.*, 2009; QUINN *et al.*, 2007).

Como em todas as demais técnicas de CLRP, o sucesso da técnica de polimerização RAFT é fortemente influenciado pelo nível de controle exercido sobre a evolução da reação de polimerização. Na prática, ocorre o crescimento linear da massa molar numérica média (M_n) com a conversão, a diminuição do índice de polidispersão (M_w/M_n) (Figura 12) e o deslocamento das distribuições das massas molares com a conversão (Figura 13) (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

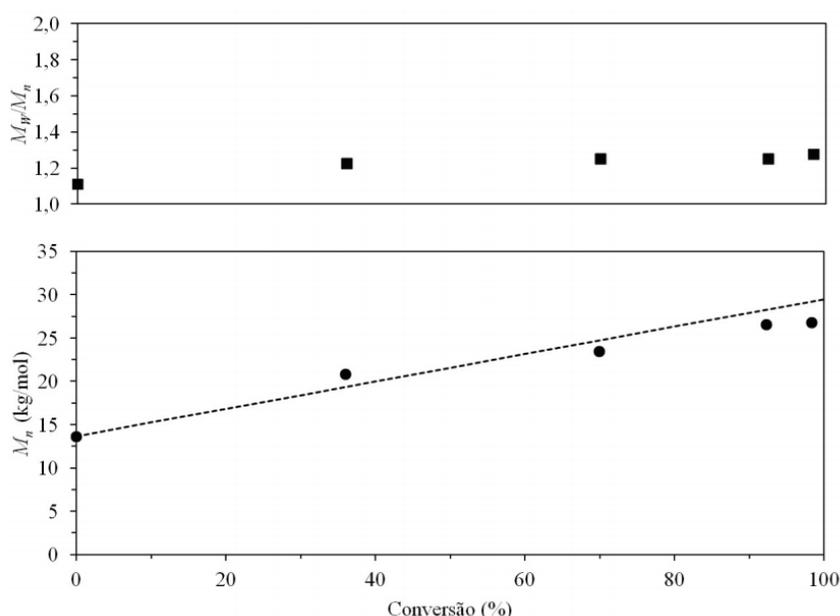


Figura 12 - Evolução do índice de polidispersão (M_w/M_n) e da massa molar média numérica (M_n) em função da conversão na presença de agente macro-radical RAFT. A curva tracejada representa o valor teórico de M_n (OLIVEIRA, 2011).

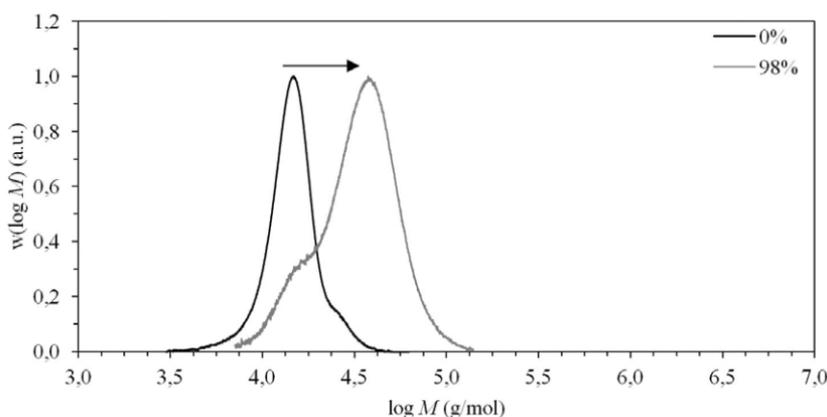


Figura 13 - Evolução da distribuição das massas molares em função da conversão na presença de agente macro-radical RAFT (OLIVEIRA, 2011).

As cadeias dos polímeros obtidos via polimerização RAFT apresentam no final o grupamento tiocarbonila do agente de transferência de cadeia, que permite a utilização a formação de polímeros de diversas arquiteturas, como a formação de blocos de copolímeros (Figura 14). Portanto, é possível utilizar os homopolímeros obtidos como macro agentes de transferência de cadeia em uma nova homopolimerização, porém na presença de outro monômero, além do macro-radical RAFT e radicais livres para iniciar a polimerização (BARNER-KOWOLLIK, 2008). Idealmente, a cadeia pode ser estendida infinitas vezes, com a formação de multi-blocos de copolímeros, à medida que o grupamento tiocarbonila do agente RAFT seja preservado no polímero final obtido.

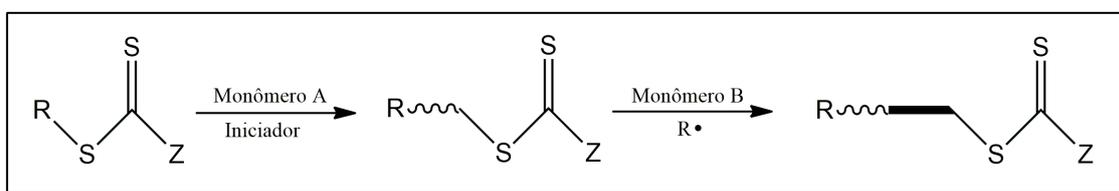


Figura 14 - Esquema da formação de blocos de copolímero via extensão de cadeia utilizando a técnica de polimerização RAFT.

Um ponto bastante explorado é a possibilidade de a massa molar numérica média teórica ($M_{n,th}$) do polímero a ser sintetizado ser calculada como função da

conversão do polímero (α), da concentração inicial do monômero e do agente RAFT, como pode ser observado na Equação 6 (MOAD *et al.*, 2005). A possibilidade de estimar a massa molar do polímero permite desenhar polímeros com estrutura complexa de forma mais precisa. Vale ressaltar que, como os agentes RAFT são naturalmente retardadores da reação de polimerização via radicais livres, os valores globais de massa molar geralmente obtidos não ultrapassam 10^5 g/mol (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

$$M_n = \left(\frac{[M]_0}{[RAFT]_0} \times M_{W_{mon\acute{o}mero}} \times \alpha \right) + M_{W_{RAFT}} \quad (6)$$

Como citado anteriormente, o agente RAFT apresenta estrutura RSC(=S)Z, em que a chave para o bom andamento do processo e para o controle da massa molar é o grupamento tiocarbonílico (SC(=S)) do CTA (CHIEFARI *et al.*, 2003; CHONG *et al.*, 2003). Vários grupamentos similares são relatados na literatura e incluem certos tritiocarbonetos, ditioésteres, xantanas, ditiocarbamatos, entre outros (Figura 15) (MOAD *et al.*, 2006). Os grupos “Z” e “R” apresentam funções específicas e a escolha desses grupos exerce influência direta sobre o grau de controle da polimerização. O grupo “Z” possui a função de ativar a dupla ligação C=S, para favorecer a adição de radicais nesta parte da molécula e proporcionar altas constantes de transferência de fragmentos. Já o grupo “R” deve ser um bom grupo de saída e re-iniciador de reações de radicais livres (RAPOPORT, 2007; BOYER *et al.*, 2009; BOYER *et al.*, 2011).

A eficiência do agente RAFT depende do monômero que está sendo polimerizado e das propriedades dos grupos “R” e “Z”, que pode ser escolhido para ativar ou desativar a dupla ligação tiocarbonílica e modificar a estabilidade dos radicais intermediários (MOAD *et al.*, 2005). A escolha do agente RAFT depende principalmente do(s) monômero(s) a ser(em) polimerizado(s) de forma controlada, o que está diretamente relacionado à estrutura do agente RAFT, principalmente de seus grupos substituintes “R” e “Z”. As principais revisões sobre o tema normalmente trazem um guia

A possibilidade do uso de uma grande variedade de monômeros e solventes (MOAD *et al.*, 2005; CHIEFARI *et al.*, 1998), da síntese de polímeros com diversos tipos de arquitetura molecular (Figura 17) (MOAD *et al.*, 2005; BARNER-KOWOLLIK, 2008) e do uso de diferentes tipos de sistemas de polimerização, incluindo polimerizações em suspensão (BIASUTI *et al.*, 2005), emulsão (KANAGASABAPATH *et al.*, 1999; ISHUGAKI e MORI, 2018), miniemulsão (PETRESKA *et al.*, 2018), miniemulsão inversa (QI *et al.*, 2007) e microemulsão (LIU *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2009), fazem com que o uso da polimerização RAFT apresente inúmeras vantagens para a síntese de polímeros para aplicações biotecnológicas. Além disso, uma vantagem única dos polímeros sintetizados com auxílio da polimerização RAFT é a possibilidade de reação dos grupos terminais das cadeias poliméricas com uma inúmera gama de reagentes, o que abre inúmeras possibilidades de funcionalização e bioconjugação dos polímeros formados (BOYER *et al.*, 2009).

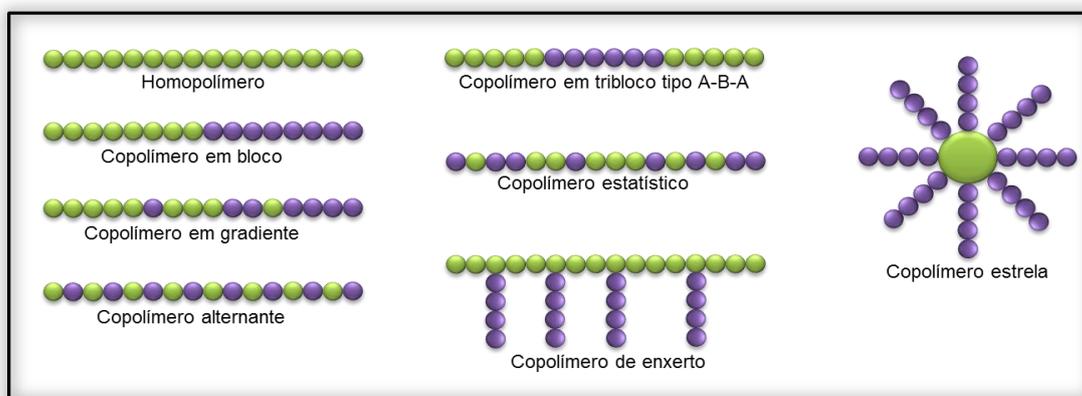


Figura 17 - Alguns tipos de arquitetura que podem ser sintetizadas com a técnica de polimerização RAFT (Adaptada de MOAD *et al.*, 2005).

Como já é bem estabelecido, são conhecidas diversas maneiras para conjugar proteínas e peptídeos por meio de reações com vários tipos de grupos funcionais. Esses grupos funcionais podem ser facilmente incorporados em agentes RAFT, levando a polímeros com grupos terminais reativos. Dependendo do *design* e da estabilidade do

agente RAFT, esses grupos funcionais podem ser inseridos no grupo iniciador (R) ou no grupo RAFT (Z). Duas abordagens básicas já foram descritas na literatura: a formação de um polímero funcionalizado com a subsequente conjugação de proteínas, ou a conjugação da proteína com o agente RAFT, seguida da polimerização (STENZEL, 2008; BOYER *et al.*, 2009).

A química do grupo tiol tem sido extensivamente aplicada à modificação de macromoléculas, já que o grupo tiol pode participar de maneira particular de uma série de transformações químicas que incluem o acoplamento dissulfeto e a alquilação por adição de alcanos halogenados, alquenos e compostos carbonílicos α ou β insaturados (como no caso da adição de Michael). Este último é um excelente exemplo de reação tiol-eno, eficiente para preparação e funcionalização de uma grande variedade de moléculas. Entre vários aminoácidos comumente utilizados como alvo para modificação de proteínas, a cisteína é particularmente atraente para a ligação sítio específica, já que existem geralmente poucos resíduos de cisteína nativos em proteínas. Dessa maneira, reações que atingem apenas os grupos do tipo tiol podem facilitar a funcionalização sítio específica. Grupos terminais vinilsulfona, maleimida e dissulfeto ativado têm sido utilizados também com sucesso em procedimentos de bioconjugação (LI *et al.*, 2011).

2.7 BIOCONJUGAÇÃO

A bioconjugação consiste em ligar ao menos uma molécula de origem biológica a compostos sintéticos e/ou biológicos, formando um novo complexo, sendo que as propriedades das moléculas iniciais são individualmente preservadas (BRASIL JÚNIOR, 2010). A bioconjugação é empregada quando se liga uma biomolécula à superfície do sistema de liberação (Figura 18), visando ao reconhecimento e à fixação no alvo desejado, de maneira que a atuação do sistema seja sítio-específica (DIMITRIU, 2001).

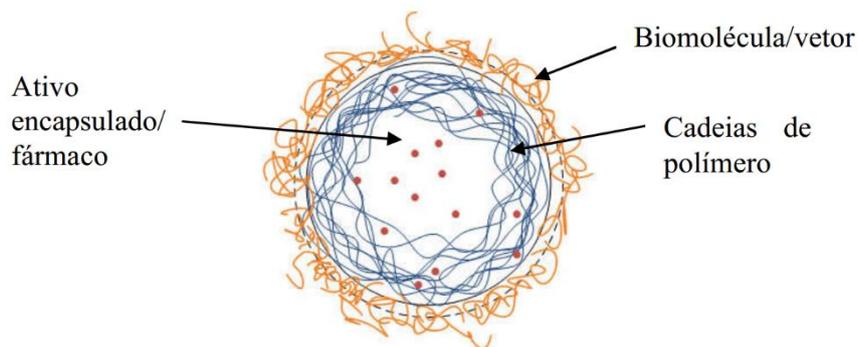


Figura 18 - Ilustração de uma partícula polimérica carregada com fármaco e com vetores (biomoléculas) na superfície (PEIXOTO, 2013).

A possibilidade de alterar os grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular dos polímeros e modificar a superfície das partículas pode viabilizar o estabelecimento de algumas interações específicas entre o polímero e o meio biológico. A imobilização sobre a superfície da partícula polimérica de camadas de compostos hidrofílicos, que respondam a estímulos ou que atuem como ligantes específicos para biomoléculas abre caminho para novas e atrativas potencialidades. Tais avanços podem resultar em polímeros com propriedades únicas, com características e estruturas bem definidas para a formulação de sistemas “inteligentes” que podem ser aplicados à liberação controlada de fármacos (PICHOT, 2004).

Os polímeros usados como biomateriais são comumente chamados de biopolímeros e podem ser de origem natural ou sintética, biodegradáveis ou não. Os biopolímeros apresentam propriedades específicas para aplicações *in vivo*, sendo compatíveis com a diversidade e complexidade destes ambientes. Nas áreas médica e farmacêutica, esses materiais têm função de interagir com sistemas biológicos para permitir avaliação, tratamento, aumento ou substituição de órgãos ou funções do corpo (TIAN *et al.*, 2012).

Muitas são as biomoléculas que podem ser usadas como ligantes (vetores). Dentre elas, podem ser citados os anticorpos monoclonais (mAb), que vêm sendo usados com muita frequência para a preparação de sistemas de carregamento de

fármacos. Segundo KIM *et al.* (2009), micelas que contém mAb são capazes de reconhecer e se ligar a várias células cancerosas *in vitro* e aumentar o acúmulo nos tumores, quando comparadas a micelas que não contém mAb, como verificado em experimentos realizados com camundongos. Como exemplo de mAb utilizados, citam-se os anticorpos Herceptin®, usado contra o fator Her-2, e o Avastin®, que é um anticorpo monoclonal que se liga ao fator de crescimento endotelial (VEGF) (KIM *et al.*, 2009).

Carboidratos como galactose, lactose e manose, também podem ser usados como ligantes específicos em sistemas de carregamento de fármacos para o tratamento de doenças do fígado, pois podem se ligar a receptores de asialoglicoproteína (ASGPR) (TIAN *et al.*, 2012). Alternativamente, podem ser usados aptâmeros. O uso de aptâmeros oferece muitas vantagens, tais como a não-imunogenicidade, a estabilidade em faixas amplas de pH e de temperatura e a especificidade tumoral (KIM *et al.*, 2009).

Vetores à base de folatos são também muito usados, pois receptores específicos são encontrados em muitas células tumorais dos pulmões, rins, ovário, mamas, cérebro, útero e testículos. MOGHIMI *et al.* (2001) enfatizaram que os folatos oferecem muitas vantagens sobre os anticorpos, quando usados como ligantes, pois são não-imunogênicos por causa do pequeno tamanho, apresentam boa estabilidade e excelente especificidade para tumores. Na forma de vitamina B, o ácido fólico é uma pequena molécula capaz de se ligar a receptores de folatos expressos mais frequentemente em células de tumores epiteliais que em tecidos normais (TIAN *et al.*, 2012).

Cientistas têm citado estes novos sistemas de liberação de fármacos sítio-dirigidos como fatores chaves para futuros avanços da eficácia e segurança dos procedimentos terapêuticos, além de melhoramentos das características físico-químicas dos fármacos e dos respectivos perfis farmacocinéticos (HAMIDI *et al.*, 2012).

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 considerados o arranjo tridimensional, o número e o espaçamento dos ligantes. 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.

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.

Um dos primeiros métodos desenvolvido para criar sistemas proteína-polímero, sob condições químicas suaves, foram baseados em reações entre o grupo carboxílicos de cadeia de poli(etileno glicol) (PEG) e aminas primárias das proteínas (CANALLE *et al.* 2010).

Outro método amplamente utilizado para a ativação de PEG em relação a aminas é a utilização de ésteres de N-hidroxisuccinamida (NHS). O composto PEG-NHS é altamente reativo em relação a aminas a pH fisiológico e forma ligações amida com proteínas (CANALLE *et al.* 2010).

De acordo com HARRIS e KOZLOWSKI (1997), a reatividade do éster de NHS parece diminuir quando a distância entre o éster ativado e o esqueleto de PEG é aumentada. Esta diferença de reatividade foi atribuída ao impedimento estérico da porção de ramificação extra. Segundo ZIMMERMANN *et al.* (2010), o PEG é altamente biocompatível e superfícies com uma densidade suficientemente elevada de PEG tornam-se resistentes à adsorção de biomoléculas, evitando ligações não específicas.

ZIMMERMANN *et al.* (2010) descreveram um protocolo geral para o acoplamento covalente de qualquer tipo de biomolécula que contenha um grupo tiol livre. O protocolo utiliza um espaçador de PEG, que possui um grupo NHS numa extremidade e um grupo maleimida na outra. Depois de reagir o grupo NHS com uma

superfície amino-funcionalizada, o grupo maleimida, altamente reativo, permite o acoplamento da biomolécula.

BAYS *et al.* (2009) sintetizaram polímeros funcionalizados com grupos maleimida por polimerização RAFT para a conjugação seletiva de sítios livres de cisteína de proteínas. Maleimida-poli((etileno glicol) metil éster acrilato) foram conjugados com lisozima.

LI *et al.* (2011) utilizaram polimerização RAFT com agente de transferência de cadeia contendo grupamento NHS para sintetizar polímeros sensíveis a temperatura para conjugação com proteínas contendo grupos amina.

No presente trabalho, a reação de bioconjugação citada por ZIMMERMANN *et al.* (2010) é utilizada; entretanto, o grupo tiol está presente nas nanopartículas, enquanto o grupo NHS reage com as biomoléculas modelo, que contêm grupamentos amina, sendo elas a lisina, a glutatona e a insulina, que, como pode ser observado na Figura 19, possuem diferentes tamanhos.

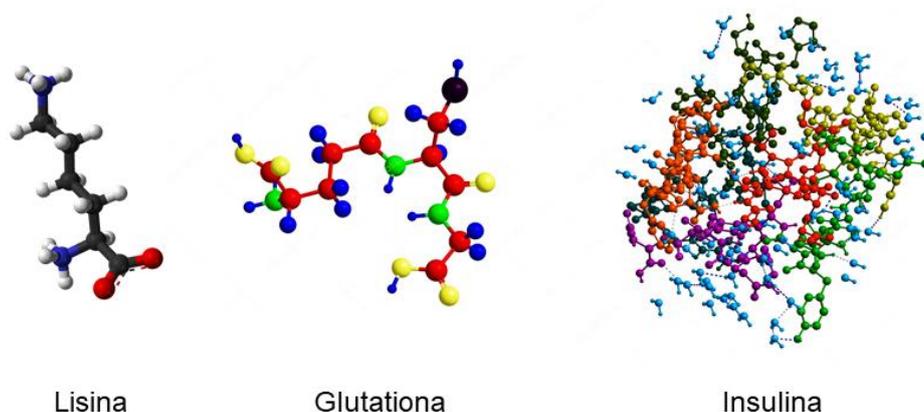


Figura 19 - Ilustração das biomoléculas modelo utilizadas nas reações de bioconjugação.

A lisina é um dos oito aminoácidos essenciais que não pode ser sintetizado pelo organismo, sendo encontrado na superfície de enzimas e proteínas. É um aminoácido essencial para o crescimento de crianças e para a manutenção do equilíbrio de nitrogênio nos adultos (PARSONS e BAKER, 1994).

O peptídeo glutationa é sintetizado no interior das células, sendo limitado de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos que o compõem (ácido glutâmico, cisteína e glicina). A glutationa exerce um papel importante no armazenamento e transporte de cisteína e na defesa celular contra radicais livres e peróxidos. Além disso, a glutationa também está envolvida no metabolismo do ácido ascórbico e na manutenção da comunicação entre as células (FORMAN *et al.*, 2009).

A insulina é uma proteína globular essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. É um polipeptídeo que pode ser sintetizado a partir de diversos animais. A insulina age numa grande parte das células do organismo, como nas células presentes no fígado, em músculos e no tecido adiposo, apesar de não agir em certas células, como as células nervosas (KING, 2003).

2.8 COMENTÁRIOS FINAIS

Neste capítulo foram apresentados alguns dos principais estudos desenvolvidos na área de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas poliméricas, obtidas a partir da polimerização radicalar RAFT. Os objetivos deste texto incluíram principalmente a contextualização e justificação do presente trabalho.

A busca por novas alternativas de encapsulamento para liberação controlada de fármaco, atrelada à vetorização dessas partículas para o tratamento de doenças como o câncer, é de extrema importância. Nesse contexto, os polímeros merecem destaque para o desenvolvimento dos sistemas de liberação, uma vez que são materiais muito versáteis e que permitem o encapsulamento *in situ* de diversos fármacos, entre eles o PTX (GALVAN, 1995; SCHORK *et al.*, 2005). Sabe-se em particular que o polímero formado por polimerização RAFT permite a conjugação com moléculas biológicas posteriormente, por conta dos grupos tiocarbonilas residuais.

Por isso, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por meio da técnica de polimerização RAFT, com posterior bioconjugação

das partículas a três diferentes biomoléculas, utilizando a maleimida-PEG-NHS como ligante. Pretende-se também encapsular o fármaco PTX, visando ao desenvolvimento de técnicas de liberação controlada. Baseado no que foi exposto, pode-se afirmar que a técnica de funcionalização aqui proposta nunca foi usada para imobilizar as biomoléculas investigadas e que o PTX nunca foi encapsulado *in situ* em nanopartículas P(MMA-co-AA), constituindo aspectos originais e relevantes do presente trabalho.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS – NANOPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados na primeira parte do trabalho são descritos a seguir. Com exceção da água, os reagentes usados não foram previamente purificados, sendo usados diretamente como recebidos.

- Surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) com pureza de 99% e 1% de umidade, em massa – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Iniciador azobisisobutironitrila (AIBN) com 98,5% de pureza em massa – MERCK (São Paulo, Brasil);
- Bicarbonato de sódio P.A. – PROQUIMIOS (Rio de Janeiro, Brasil);
- n-Hexadecano P.A. – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Agente de transferência de cadeia (agente RAFT) 2-ciano-2-propilditiobenzoato (CPBD) HPLC com pureza de 97% em massa - Sigma Aldrich (Missouri, EUA);
- Hidroquinona 99% de pureza em massa – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Monômero metacrilato de metila (MMA) 99,5% em massa, estabilizado – Sigma Aldrich (Missouri, EUA);
- Monômero ácido acrílico (AA) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);

- Nitrogênio, fornecido pela Linde Gás/AGA S/A (Munique, Alemanha) com pureza mínima de 99,9%, usado para manter a atmosfera inerte nas reações de polimerizações em miniemulsão;
- Paclitaxel, fármaco utilizado para encapsulamento, fornecido pela empresa Carbosynth (Berkshire, Reino Unido), com pureza mínima de 97%;
- Acetona P.A com 99,5% de pureza em massa, usada para limpeza de vidrarias e equipamentos – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Etanol P.A com 99,8% de pureza em massa, utilizado para limpeza de vidrarias e equipamentos – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- Diclorometano P.A com pureza mínima de 99,9% - Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- Tensoativo polisorbato 80 (Tween 80) - Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil);
- 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% em massa - Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil).

Todos os experimentos foram realizados com água ultra pura (Milli-Q).

3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Os equipamentos e acessórios utilizados durante as reações de polimerização estão discriminados abaixo.

- Placa de agitação – IKA, modelo C-MAG HS 7 (Staufen, Alemanha) com controle de temperatura por meio de termopar (IKA, modelo ETS-D5);
- Balança analítica – Bel Engineering, modelo U210A (São Paulo, Brasil);
- Sonicador – Branson Digital Sonifier®, modelo 450 (Missouri, EUA);
- Estufa com recirculação – Quimis, modelo Q317M-72 (São Paulo, Brasil);

- Analisador de tamanho de partícula – Malvern Instruments (Worcestershire, Inglaterra, Reino Unido), modelo Nano ZS, usado para determinação de tamanhos de partículas com base em técnicas de espalhamento de luz;
- Cromatógrafo de permeação em gel – Viscotek (Houston, EUA), modelo GPC Max VE2001, equipado com uma pré-coluna Shodex KF-G, duas colunas Shodex KF-804 e uma coluna Shodex KF-805, além de detector refratométrico, modelo VE 3580, e detector UV Viscotek, modelo 2500, setado para 255 nm e equipado com lâmpada de deutério (Tóquio, Japão). Como fase móvel e para solubilização das amostras foi utilizado tetrahydrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc (Fairfield, EUA);
- Cromatógrafo de alta eficiência (HPLC) – Agilent Technologies (Santa Clara, EUA), modelo Agilent 1200 e coluna XDB C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Como fase móvel foi utilizada acetonitrila (ACN) grau HPLC, fornecida pela Tedia Company Inc. (Fairfield, EUA) e água ultra pura;
- Agitador orbital ou shaker – Nova Ética (Rio de Janeiro, Brasil);
- Centrífuga – Thermo Scientific (Massachusetts, EUA), modelo Megafuge 16R;
- Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) – Perkin Elmer (Massachusetts, EUA, modelo DSC 8500);
- Analisador Térmico TGA – Perkin Elmer (Massachusetts, EUA), modelo STA-6000, utilizado para as análises de degradação térmica do fármaco.

3.3 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

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) e ácido acrílico (AA).

3.3.1 Reações de polimerização em miniemulsão

As nanopartículas de PMMA e de copolímero P(MMA-co-AA) foram preparadas conforme o procedimento experimental 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 do 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, iniciador, agente RAFT e hexadecano, o co-estabilizante, foi adicionada à fase aquosa, formando uma pré-emulsão, também homogeneizada por agitação magnética por 15 minutos em banho de gelo.

Em seguida, ainda em banho de gelo, para evitar a polimerização e a volatilização do monômero, a pré-emulsão foi levada ao sonicador para uma melhor dispersão e com o intuito de diminuir o tamanho das gotas, durante 10 minutos sob 70% de amplitude, gerando uma potência de 50 W.

Após a obtenção da miniemulsão no sonicador, ainda em banho de gelo, a mistura foi transferida para um balão de fundo redondo contendo uma barra de agitação magnética. O balão foi vedado com septo de borracha e um arame foi amarrado fortemente em volta do balão para reforçar a vedação.

Durante 45 minutos foi feita uma purga com nitrogênio na solução contida no balão. Com auxílio de uma agulha descartável, foi feito um pequeno orifício na superfície do septo (Figura 20). A agulha foi deixada encaixada no septo, funcionando como um canal para entrada e saída de ar. Com auxílio da cânula de amostragem, foi feito um segundo orifício na superfície do septo. Enquanto a extremidade da cânula de amostragem localizada na parte interna no balão encontrava-se submersa na solução, a outra extremidade da cânula, localizada na parte externa do balão, foi conectada à linha de nitrogênio.

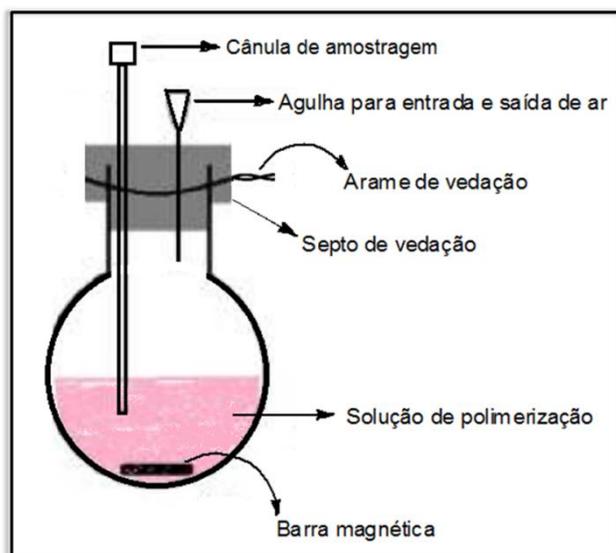


Figura 20 - Esquema do aparato experimental usado para conduzir a reação de polimerização.

Após o tempo de purga, as agulhas foram retiradas, os orifícios foram vedados com graxa e o balão foi transferido para um recipiente contendo etileno glicol a 80 °C durante 5 horas. A medida da temperatura do meio reacional era realizada com um termopar tipo J, em contato direto com o banho de etileno glicol. O controle de agitação foi realizado com auxílio da placa de aquecimento/agitação (nível 5), mantida sempre no mesmo valor durante todas as etapas de reação e em todas as reações realizadas.

Após o término da reação, as soluções finais de polímero foram armazenadas em frasco de vidro âmbar e mantidas a 25 °C e sob abrigo da luz.

3.3.2 Avaliação da influência da proporção fase orgânica/fase aquosa na produção das nanopartículas

Inicialmente foram realizados experimentos para avaliação do efeito da quantidade de fase orgânica sobre a produção das nanopartículas. As quantidades de fase orgânica no meio reacional foram iguais a 10 e 20% em massa, variando-se também a presença e a ausência do agente RAFT.

As condições das reações de polimerização em miniemulsão realizadas estão descritas na Tabela 1. Os ajustes foram realizados visando a obter a melhor relação entre a velocidade da reação, o rendimento e tamanho das partículas do polímero final obtido.

Tabela 1 - Composições iniciais usadas nas reações de polimerização.

	Reagentes	M1 (80%)	M2 (80%)	M3 (90%)	M4(90%)
Fase orgânica	Monômero	19,110	19,110	9,555	9,555
	Hexadecano	0,600	0,600	0,300	0,300
	Iniciador	0,078	0,078	0,039	0,039
	Agente RAFT	-	0,214	-	0,107
Fase aquosa	Água	80	80	90	90
	Surfactante	1.000	1.000	0.478	0.478
	Bicarbonato de sódio	0,100	0,100	0,113	0,113

3.3.3 Encapsulamento do fármaco paclitaxel

Para alcançar uma alta eficiência de encapsulação do fármaco paclitaxel pela técnica de polimerização em miniemulsão *in situ*, é necessário que o fármaco apresente boa solubilidade na fase orgânica.

Em função da baixa solubilidade do paclitaxel no monômero MMA observada quando a fase orgânica foi misturada à fase aquosa, adicionou-se à fase orgânica o monômero AA na concentração de 10% (m/m) em relação ao MMA, visando aumentar a hidrofiliabilidade da mistura (FENG e LI, 2006).

Em função da limitação na quantidade do fármaco disponível, uma vez que este apresenta custo elevado, optou-se por não realizar testes de solubilidade do fármaco e utilizar concentrações de 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00% (m/m) de paclitaxel em relação à fase orgânica. As polimerizações também foram realizadas na ausência e na presença do fármaco e do agente RAFT. A Tabela 2 apresenta as massas dos reagentes utilizados nos experimentos.

Tabela 2 - Composições usadas nas reações de polimerização para encapsulamento do paclitaxel.

	Reagentes	Massa (g)	
Fase orgânica	MMA	4,5	
	AA	0,5	
	Iniciador	0,0196	
	Agente RAFT	0,0536	
	Fármaco	0,25%	0,0125
		0,50%	0,025
		0,75%	0,0375
1,00%		0,05	
Hexadecano	0,15		
Fase aquosa	Água	20	
	Surfactante	0,25	
	Bicarbonato de sódio	0,025	

3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Os látices produzidos foram caracterizados em relação ao tamanho de partícula e por análises térmicas (TGA e DSC). Além disso, avaliaram-se os produtos obtidos nas reações de polimerização em termos de conversão e das distribuições de massas molares.

3.4.1 Conversão por gravimetria

A avaliação da conversão de monômeros nas reações de polimerização foi realizada por gravimetria, que consiste na avaliação da razão entre a massa de polímero presente no reator e a massa de monômero inicialmente adicionada na formulação, de acordo com a Equação 7. Para conduzir essa análise, alíquotas do meio reacional foram retiradas em intervalos de tempos estabelecidos e as massas das alíquotas foram aferidas antes e após a adição de cinco gotas de solução aquosa de hidroquinona 1%

(m/m). A solução de hidroquinona foi utilizada para inibir a reação e interromper o consumo de monômero.

$$X_p = \frac{M_{pol\ seco+cápsula} - (M_{cápsula} + M_{hidroquinona})}{\varphi_{orgânica} \cdot M_{látex}} \quad (7)$$

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

A massa de polímero foi obtida a partir da subtração da massa de hidroquinona e da fração de sólidos não poliméricos presentes no resíduo seco. Durante a reação, alíquotas de 2 mL foram retiradas do reator com auxílio da cânula de amostragem e seringa de plástico de 5 mL. Essas amostras coletadas eram transferidas para cápsulas de vidro previamente taradas. Os pesos da amostra sem e com hidroquinona foram anotados e as cápsulas de porcelana foram levadas à estufa de recirculação a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, o polímero seco obtido e com peso constante foi novamente pesado.

3.4.2 Distribuições de massas molares

A técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica cromatográfica que utiliza o tamanho das moléculas como critério de separação e encontra aplicação para a determinação de massas molares de polímeros. É feito o bombeamento da amostra em solução através de uma coluna que contém um gel poroso e que compõe a fase estacionária. A separação ocorre por conta dos diferentes tamanhos de poros do gel da coluna e das moléculas analisadas. Dependendo do tamanho das cadeias e da interação com o gel (idealmente as moléculas não devem interagir quimicamente com o gel), as moléculas da amostra se movem com diferentes

velocidades dentro da coluna, sendo detectadas em tempos diferentes. Dessa forma, as cadeias maiores são detectadas mais rapidamente e as menores posteriormente, uma vez que moléculas maiores não penetram nos poros da coluna e são eluídas primeiro. As moléculas menores são pequenas o suficiente para penetrar em diversos poros, percorrendo um caminho mais longo (RODRIGUEZ *et al.*, 2003).

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 análise, 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-se o solvente THF como fase móvel, mantida a vazão constante de 1,0 mL/min.

3.4.3 Tamanho das partículas

A distribuição de tamanhos de partículas (DTP) foi determinada por espalhamento dinâmico da luz, utilizando um analisador de tamanhos de partícula da marca Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS. Nesta técnica, o movimento das partículas faz com que o feixe de luz que atravessa a amostra seja espalhado com intensidades diferentes, a depender do tamanho e do ângulo de espalhamento. A análise das flutuações de intensidade de luz espalhada permite calcular a velocidade do movimento browniano das partículas e, assim, o tamanho pode ser calculado utilizando a relação Stokes.

Para as análises de tamanho de partícula, adicionaram-se uma ou duas gotas da amostra e completou-se o volume da cubeta com água destilada, até obter uma suspensão translúcida. A diluição das amostras é necessária para evitar a possibilidade de espalhamento múltiplo. Em seguida, a cubeta era transferida para o módulo de

medição do equipamento. Os resultados foram calculados com base na equação de Smoluchowski (BUTT *et al.*, 2003) e apresentados como uma média de três medidas.

3.4.4 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 avaliar a possível interação química entre o fármaco e o polímero. Nestes ensaios, realizou-se apenas um aquecimento 25 a 230 °C de cerca de 10 mg da amostra, a uma taxa de 10 °C/min, sob atmosfera de N₂.

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento da marca Perkin Elmer (Massachusetts, EUA), modelo DSC 8500.

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 paclitaxel. Os testes foram realizados na faixa de 25 a 800 °C, a 10 °C/min.

As análises de TGA foram realizadas com amostras de 10 mg em um analisador térmico da marca Perkin Elmer, modelo STA-6000 (Massachusetts, EUA). As análises foram conduzidas em atmosfera inerte, com utilização de nitrogênio na vazão de 20 mL/min.

3.5 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.

No presente trabalho, a eficiência de encapsulamento foi avaliada pela técnica de extração do fármaco em diclorometano. Nesta técnica, a fração do fármaco encapsulada pode ser obtida a partir da extração em amostras secas por um solvente adequado. 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. Para a extração, preparou-se uma suspensão de 50 mg de nanopartículas em 2 mL de diclorometano, a partir de uma amostra previamente seca. Após evaporação do diclorometano, o polímero foi disperso em 5 mL de acetonitrila e filtrado em membrana de 0,22 µm para completa separação dos sólidos.

A concentração do fármaco foi determinada por análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), no cromatógrafo da JASCO (Tóquio, Japão) equipado com injetor automático (JASCO AS-2059 Plus), detector UV-VIS (JASCO UV-2075) e uma bomba (JASCO PU-2087). De acordo com a Tabela 3, 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 paclitaxel foi determinado em 227 nm, de acordo com RAJAEI e FARZI (2015), e o tempo de cada corrida foi estabelecido como igual a 6 min. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL e os ensaios foram realizados em temperatura ambiente.

A curva analítica foi construída em oito níveis de concentração, no intervalo de 1 a 100 µg/mL. Para a montagem da curva, preparou-se uma solução estoque de paclitaxel em ACN de 100 µg/mL. A partir dessa solução, foram realizadas diluições,

obtendo-se as concentrações de 5, 10, 15, 30, 50, 70, 85 e 100 µg/ml, sendo avaliadas três curvas.

Avaliou-se a capacidade de o método medir exatamente o fármaco paclitaxel na presença de outros componentes, como impurezas e demais constituintes do sistema. Para tal realizou-se a análise cromatográfica dos componentes do sistema separadamente, sendo eles os látices poliméricos na presença e na ausência do agente RAFT, sendo os cromatogramas obtidos posteriormente analisados em conjunto.

Tabela 3 - Condições usadas para o método cromatográfico utilizado para quantificação do paclitaxel.

Parâmetro	Condição
Fase móvel	Acetonitrila/Água (90/10) (v/v)
Modo	Isocrático
Fluxo	1 mL/min
Comprimento de onda	227 nm
Injeção	20 µL
Tempo	6 min (retenção em 3,4 min)
Temperatura	Ambiente

3.6 TESTE DE LIBERAÇÃO

Os estudos do perfil de liberação do fármaco *in vitro* foram realizados com o objetivo de avaliar a quantidade de fármaco liberado. O ensaio de liberação foi realizado em condições que tentavam simular as condições *in vivo*. Dessa forma, utilizou-se o tampão fosfato salino (PBS) no pH de 7,4 como meio de dissolução na temperatura de 37 °C e sob constante agitação (100 rpm). Os testes foram conduzidos colocando o látex diretamente em contato com o meio de liberação. A fim de obter a concentração de 2 µL/ml de PTX, os látices poliméricos foram dispersos em 5 mL de tampão fosfato salino contendo 3% de Tween 80 em tubos Falcon. Em tempos determinados (4, 8, 24, 48, 72 e 96 h) os tubos Falcon eram retirados e centrifugados. Após adequada

purificação da amostra recolhida por filtração em membrana de 100 kDa (AMICON Ultra-15 100 K, Millipore) a 6000 rpm por 15 min a 20°C, a concentração do fármaco liberado na fase receptora foi verificada, inicialmente por medidas em espectrofotômetro UV-VIS. Dessa forma não foi verificada a liberação do PTX nos ensaios, sendo necessário o uso de HPLC, que apresenta uma maior sensibilidade. Todas as amostras injetadas no cromatógrafo foram previamente filtradas em filtro de seringa de 22 µm para evitar entupimento nas linhas do equipamento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO – NANOPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO

4.1 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

As reações de polimerização foram realizadas utilizando a técnica de miniemulsão para a produção de nanopartículas, utilizando o metacrilato de metila (MMA) como monômero. Este monômero foi escolhido devido ao fácil acesso, versatilidade, boa reatividade e boa compatibilidade com cinco dos sete agentes RAFT disponíveis para compra no mercado nacional. Além disso, o MMA possui boa biocompatibilidade e amplo uso em sistemas de liberação de fármacos (CASTOR JR., 2019; ODIAN, 2004; ORÉFICE e VILLANOVA, 2010).

Realizaram-se, inicialmente, experimentos para a avaliação do efeito da proporção de fase orgânica e fase aquosa sobre a produção das NPs. As quantidades de fase orgânica no meio reacional foi de 10 e 20% (m/m) em relação à massa total da miniemulsão, variando-se também a presença e a ausência do agente RAFT.

4.1.1 Conversão por Gravimetria

Com base nos trabalhos da literatura (MOREIRA, 2015; ZHOU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009), primeiramente testaram-se condições reacionais (M1 e M2) usando 5% de LSS (m/m) em relação à massa de monômero e 80% de fase aquosa (m/m) em relação à massa total da miniemulsão, na presença e ausência de agente RAFT na temperatura de 80 °C. Posteriormente, reações contendo 90% de fase aquosa (m/m)

em relação à massa total da miniemulsão foram realizadas (M3 e M4), para fins de comparação. As quantidades de agente RAFT e monômero utilizadas em todas as reações foram calculadas de maneira a obter um polímero de massa molar 20.000 g/mol, como mostrado no APÊNDICE C, visando um melhor aproveitamento do efeito EPR em que as moléculas não devem apresentar baixa 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 adicionada, em intervalos de tempos definidos.

Apresentam-se na Figura 21 as curvas de conversão em relação ao tempo obtidas nas reações de polimerização em miniemulsão, M1 a M4.

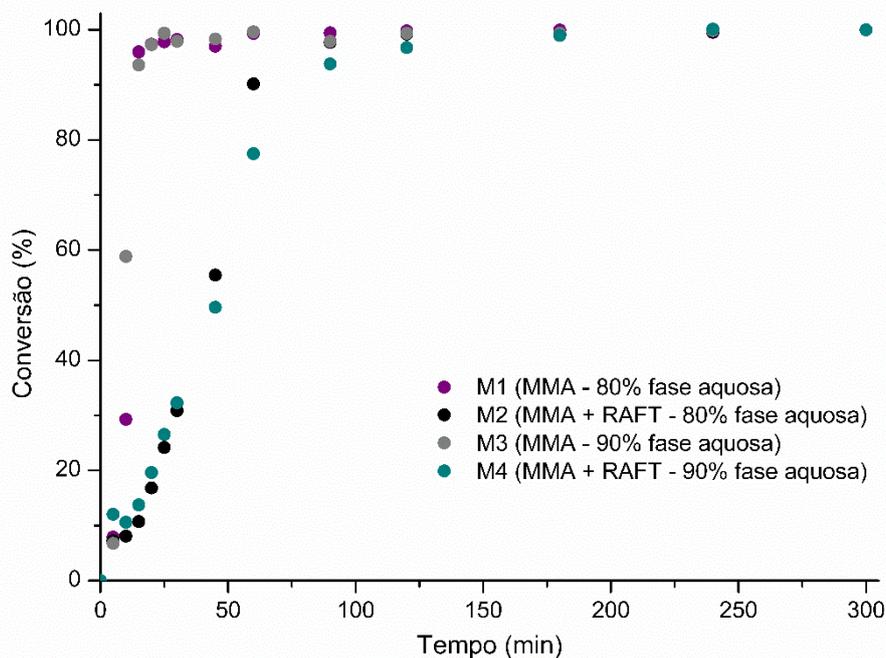


Figura 21 - Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão M1 a M4.

Nestas condições, as reações de polimerização conduzidas na ausência do agente RAFT alcançaram conversões de aproximadamente 90% logo nos primeiros

minutos de acompanhamento e conversão total até o final das reações. As reações conduzidas via polimerização controlada por agente RAFT atingiram conversão máxima apenas após 120 minutos de reação. A redução da taxa e reação na presença do agente RAFT já era esperada, como discutido no Capítulo 3 e na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Perfis similares de conversão podem ser observados nas reações M1 e M3, na ausência de agente RAFT, e nas reações M2 e M4, na presença do agente RAFT. Isto já era esperado, uma vez que o aumento da fração de fase aquosa no meio reacional não deve interferir na conversão do monômero, quando a distribuição inicial de tamanhos não é afetada pelas variáveis de operação (AMBROGI, 2015). Isso também atesta a excelente reprodutibilidade experimental obtida.

4.1.2 Tamanho das partículas

Foram concentrados esforços na manutenção da estabilidade coloidal e na regularização do tamanho de partículas, de maneira que os diâmetros se encontrassem na faixa requerida de 50 a 150 nm, descrita por MARCUCCI e LEFOULON (2004) como ideal para o acesso (via EPR) a células e tecidos doentes.

Sabe-se que o tamanho médio e a distribuição dos tamanhos de partículas dependem, entre outros fatores, do sistema de reação, do método de homogeneização e dos parâmetros definidos para a operação do método de homogeneização escolhido. Em função da pouca disponibilidade do agente RAFT e devido à boa eficiência do processo, o método escolhido para homogeneização do sistema nas reações de polimerização em miniemulsão foi o método de ultrassom.

A Figura 22 mostra as variações do tamanho de partícula em cada tempo de reação para as reações M1 a M4, em que é possível observar que nas reações M1 e M3 conduzidas na ausência do agente RAFT as distribuições de tamanhos de partícula se mantêm iguais durante toda a reação, diferentemente das reações M2 e M4,

conduzidas na presença do agente RAFT, que apresenta um deslocamento nas distribuições de tamanho de partícula para tamanhos maiores, levando a crer que o retardo causado pelo agente RAFT na conversão dos monômero leva à coalescência das gotas e degradação difusional.

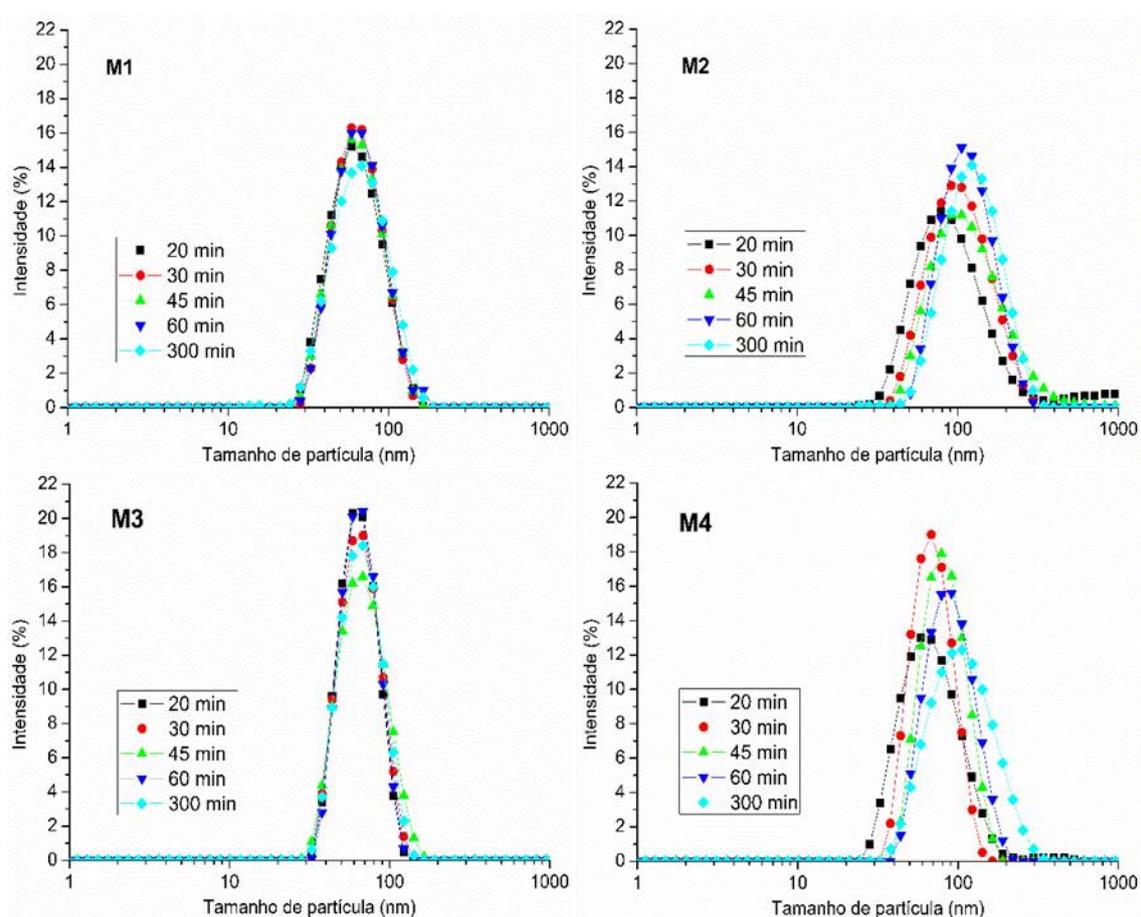


Figura 22 - Distribuição de tamanhos de partícula nos experimentos M1 a M4.

Além disso, pode-se observar que as reações M1 e M2 conduzidas com 80% de fase aquosa apresentaram distribuições de tamanhos mais largas que aquelas conduzidas com menores cargas de fase orgânica (M3 e M4). As partículas obtidas via polimerização radicalar convencional (M1 e M3) apresentaram tamanhos médios próximos a 65 nm e as partículas obtidas via polimerização radicalar RAFT apresentaram tamanhos médios próximos a 110 nm, adequados para a circulação no organismo e aplicação na liberação de fármaco (HUSSAIN *et al.*, 2001).

Corroborando os resultados observados nos gráficos anteriores, os cálculos feitos para quantificação do percentual de surfactante livre, mostrados no APÊNDICE A, indicam que não existem micelas livres por excesso de surfactante nas condições de reação, de maneira que pode ser descartada a hipótese de nucleação micelar. Essa hipótese é reforçada pelas distribuições de tamanho estreitas e monomodais.

Por apresentarem tamanhos de partícula satisfatórios para aplicações em sistemas de liberação sítio-dirigidos as reações M1 e M2, conduzidas com 80% de fase aquosa, foram selecionadas para serem utilizadas nas próximas etapas do trabalho.

4.1.3 Distribuição de Massas Molares

A evolução das reações de polimerização também foi avaliada por meio do acompanhamento das distribuições de massas molares dos polímeros em cada tempo de reação. Os resultados obtidos nesta análise permitem avaliar o sucesso da polimerização via RAFT.

As distribuições de massas molares obtidas na reação conduzida na ausência de agente RAFT, M1 (Figura 23), mostram a sobreposição das distribuições de massas molares em diferentes tempos de reação. Desta forma, pode-se observar que elevadas massas molares são obtidas nos primeiros minutos de reação. Observa-se a ocorrência de um leve deslocamento das curvas para menores massas molares com o tempo de reação, indicando a depleção do monômero e o alcance da conversão máxima. Além disso, os resultados de massa molar obtidos para a reação de polimerização convencional em miniemulsão do PMMA apresentaram resultados numéricos bastante elevados, como pode ser observado na Tabela 4, o que já era esperado para polímeros sintetizados por mecanismo de polimerização via radicais livres em miniemulsão. O índice de polidispersão ao redor de 2 também já era esperado, por se tratar de reação controlada por terminação e por desproporcionamento (LUCAS *et al.*, 2001). Os

resultados reforçam a adequação dos procedimentos adotados e a excelente reprodutibilidade do esquema experimental proposto.

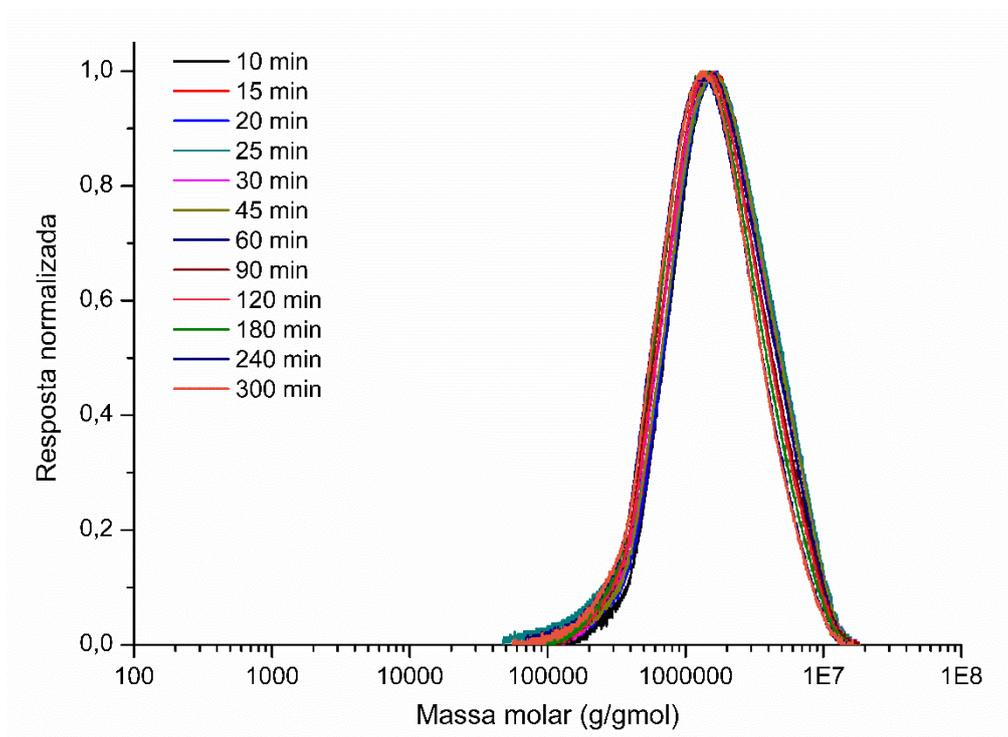


Figura 23 - Distribuições de massas molares dos produtos da reação M1, na ausência do agente RAFT.

Para a reação M2, conduzida na presença do agente RAFT, as distribuições de massas molares (Figura 24) mostram o deslocamento das curvas para maiores valores de massa molar, à medida que ocorre o avanço do tempo de reação. Este fato é consistente com um processo de polimerização radicalar livre controlada (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Tabela 4 - Massas molares numérica (Mn) e ponderal (Mw) e índice de polidispersão finais dos produtos obtidos nas reações M1 e M2

Reação	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	IPD
M1	$8,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	2,09
M2	$1,9 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	1,13

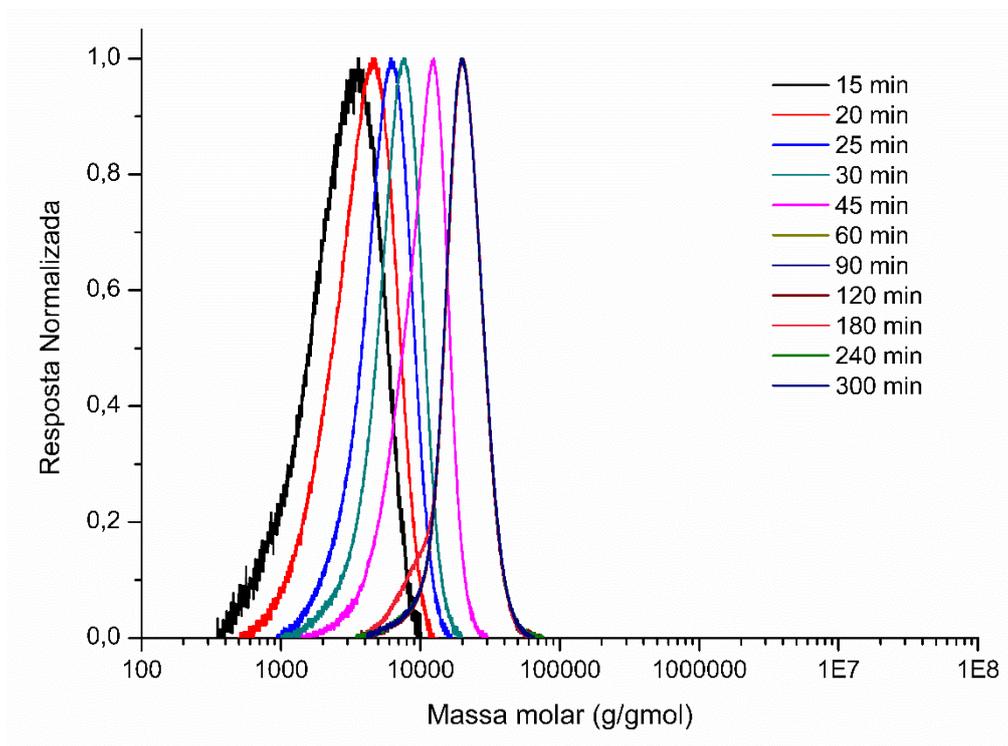


Figura 24 - Distribuições de massas molares dos produtos da reação M2, conduzida na presença do agente RAFT.

Além do deslocamento das distribuições de massas molares para valores mais elevados, o “controle” de reações do tipo CLRP pode ser avaliado também pelos dados de evolução da massa molar numérica média (M_n) em função da conversão do monômero. A Figura 25 mostra a evolução dos valores de M_n das reações M1 e M2, conduzidas na ausência e na presença do agente RAFT, respectivamente. Pode-se observar que os valores de M_n da reação M2 crescem linearmente com a conversão, alcançando valores próximos aos teóricos, calculados no APÊNDICE C. Esse feito não é observado para a reação M1, realizada na ausência do agente RAFT. Pode-se concluir que o crescimento da massa molar foi aproximadamente linear na reação conduzida na presença do agente RAFT, como esperado, pois a regressão linear dos pontos obtidos permite obter valores de coeficiente de correlação (R^2) de 0,99. Parece, portanto, bastante claro que as reações foram conduzidas a contento tanto na ausência como na presença do agente RAFT.

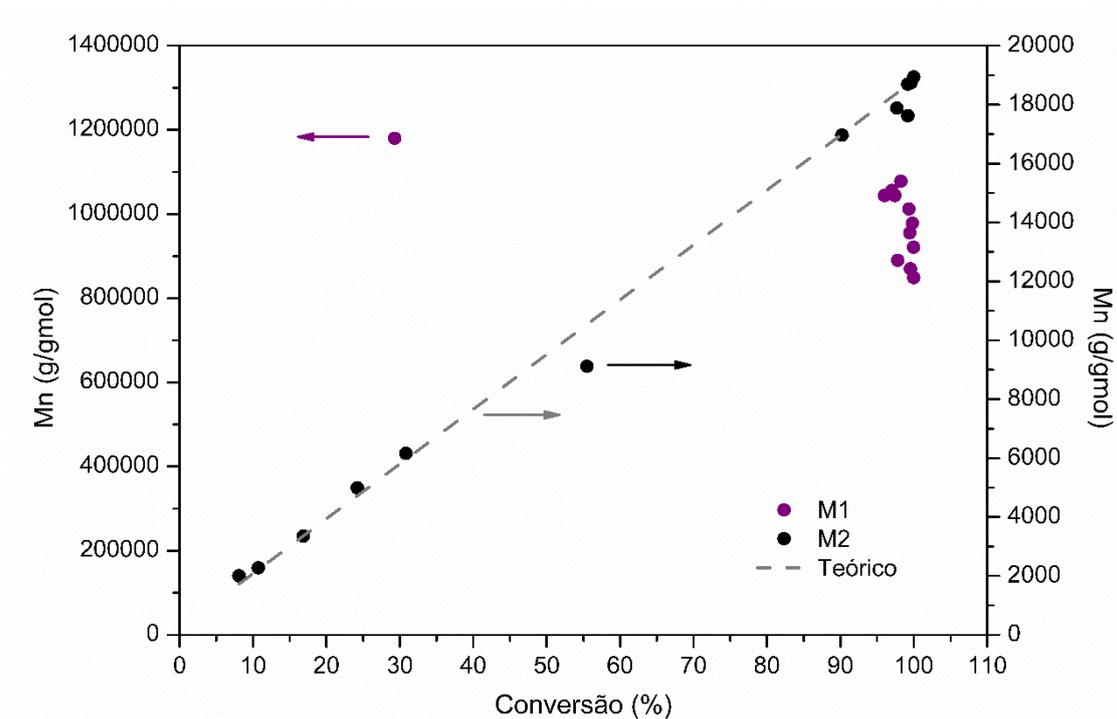


Figura 25 - Evolução da massa molar numérica média em função da conversão nos produtos das reações M1 (polimerização radicalar convencional) e M2 (polimerização radicalar RAFT), e evolução da massa molar numérica média teórica em função da conversão da reação M2.

4.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 26 mostra as curvas de degradação térmica das amostras M1, sintetizada por polimerização radicalar convencional, e M2, sintetizada por polimerização radicalar RAFT. É possível observar que o polímero M1 apresenta maior estabilidade térmica que o polímero M2, uma vez que o polímero M2 começa a degradar em aproximadamente 195 °C, enquanto o polímero M1 começa a degradar a 220 °C. Esse comportamento é distinto daquele reportado por BRESSY *et al.* (2013), que observaram que o PMMA produzido por polimerização radicalar RAFT apresentou maior estabilidade térmica que o produzido por polimerização radicalar convencional. Esta diferença pode estar relacionada à massa molar dos polímeros. Os polímeros reportados por BRESSY *et al.* (2013) apresentavam Mn na mesma ordem de grandeza, sendo $4,8 \cdot 10^4$ g/mol para o PMMA produzido por polimerização radicalar convencional

e $1,02 \cdot 10^4$ g/mol para o PMMA produzido por polimerização radicalar RAFT. No presente trabalho, o polímero M2 apresenta M_n de $1,9 \cdot 10^4$ g/mol (similar ao reportado por BRESSY *et al.* (2013)), enquanto o polímero M1 apresenta M_n igual a $8,5 \cdot 10^5$ g/mol (muito maior que o reportado por BRESSY *et al.* (2013)). Sabe-se que cadeias poliméricas menores apresentam menor estabilidade térmica que aquelas maiores, levando-se em conta a maior suscetibilidade dos grupos terminais de cadeia à degradação. Assim, quanto menor é a massa molar, maior é o número de grupos terminais de cadeias disponíveis e menor é a estabilidade térmica (LUCAS *et al.*, 2001).

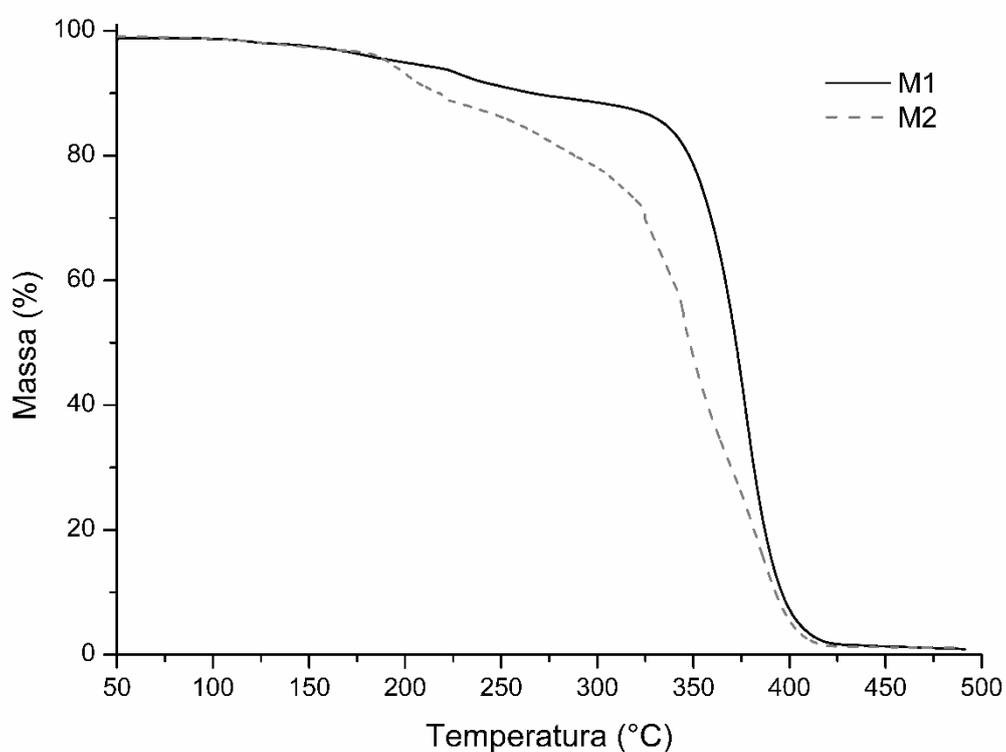


Figura 26 - Termogramas dos polímeros M1, sintetizado por polimerização radicalar convencional, e M2, sintetizado por polimerização radicalar RAFT.

4.2 ENCAPSULAMENTO DO FÁRMACO PACLITAXEL

Todas as reações realizadas para encapsulamento do fármaco foram conduzidas com e sem o uso do agente RAFT para fins de comparação. O metacrilato

de metila (MMA) foi escolhido como monômero principal por ser biocompatível e por já ser largamente empregado nas áreas médica e farmacêutica. As reações são apresentadas na Tabela 5, em que se pode observar que o MMA foi usado como monômero principal e utilizou-se 10% (m/m) do comonômero ácido acrílico (AA), visando a aumentar a hidrofilicidade dos polímeros, que sabidamente prolonga o tempo de circulação na corrente sanguínea e aumenta a aceitação das células, além aumentar a solubilidade do fármaco na fase orgânica. Com isso, realizaram-se as reações na presença e na ausência do fármaco e na presença e na ausência do agente RAFT, para fins de comparação. As quantidades de fármaco também foram variadas para fins de comparação.

Tabela 5 – Reações de encapsulamento do fármaco paclitaxel.

Reação	Comonômero	RAFT	PTX
R1	Não	Não	-
R2	Não	Sim	-
R3	Sim	Não	-
R4	Sim	Sim	-
R5	Sim	Não	1%
R6	Sim	Sim	1%
R7	Sim	Não	0.75%
R8	Sim	Sim	0.75%
R9	Sim	Não	0.50%
R10	Sim	Sim	0.50%
R11	Sim	Não	0.25%
R12	Sim	Sim	0.25%

O fármaco paclitaxel (PTX) foi adicionado à fase orgânica da receita experimental. A Figura 27 apresenta o aspecto visual da mistura formada pelo fármaco,

pelo agente RAFT e os monômeros MMA e AA, a interface O/A e a pré-emulsão obtida após agitação magnética das fases. A coloração rósea observada na mistura é devida ao agente RAFT, que apresenta coloração vermelha.

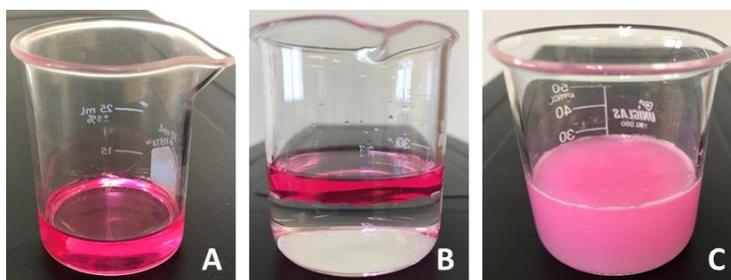


Figura 27 - Aspecto visual do sistema formado com o agente RAFT e o fármaco paclitaxel, sendo (A) a solubilização do agente RAFT e do fármaco no monômero, (B) a interface O/A e (C) a pré emulsão obtida após agitação magnética.

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 paclitaxel utilizado nos testes. O termograma obtido é apresentado na Figura 28. Pode-se verificar que a temperatura de degradação do paclitaxel está em torno de 240 °C, que é muito maior que a temperatura de 80 °C utilizada nas reações, o que garante a integridade do fármaco. Dessa forma, a incorporação *in situ* do fármaco na reação parece segura.

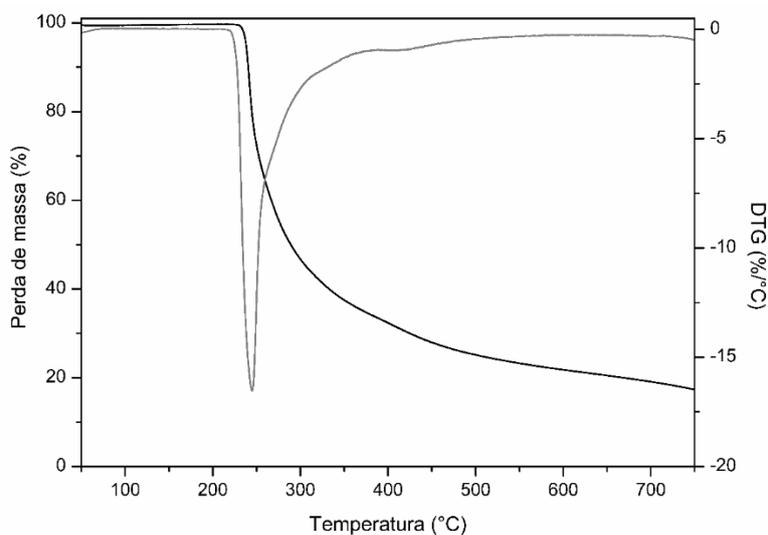


Figura 28 - Termograma de TGA do fármaco paclitaxel.

4.2.1 Conversão e massa molar

Em função da necessidade de acrescentar um comonômero às reações de polimerização para encapsulamento do fármaco, as conversões das reações realizadas na ausência de fármaco foram analisadas para fins de comparação. Portanto, a Figura 29 apresenta as curvas de conversão dessas reações, sendo possível observar que o perfil da conversão não foi alterado com o acréscimo do comonômero AA, apresentando-se mais lento na presença do agente RAFT, conforme esperado.

Na Figura 30 são apresentadas as curvas de conversão das reações realizadas na presença e na ausência do fármaco. Observa-se que a adição de fármaco ao sistema não resultou em alteração significativa da dinâmica da reação de copolimerização, mesmo quando na presença do agente RAFT, indicando que as etapas de ativação e desativação dos radicais nas cadeias em crescimento não foi afetado.

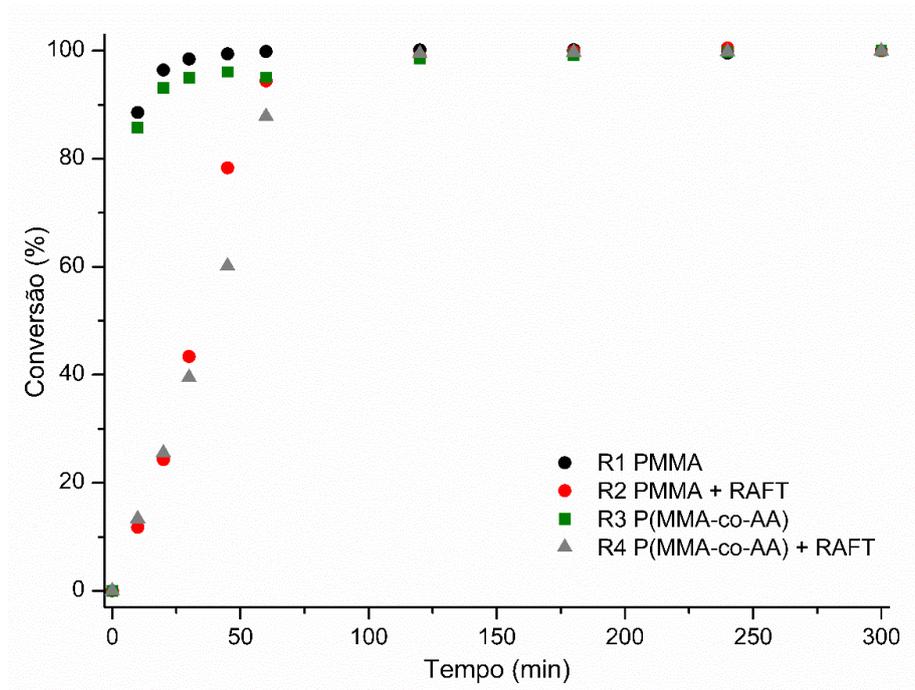


Figura 29 - Curvas de conversão das reações R1, R2, R3 e R4.

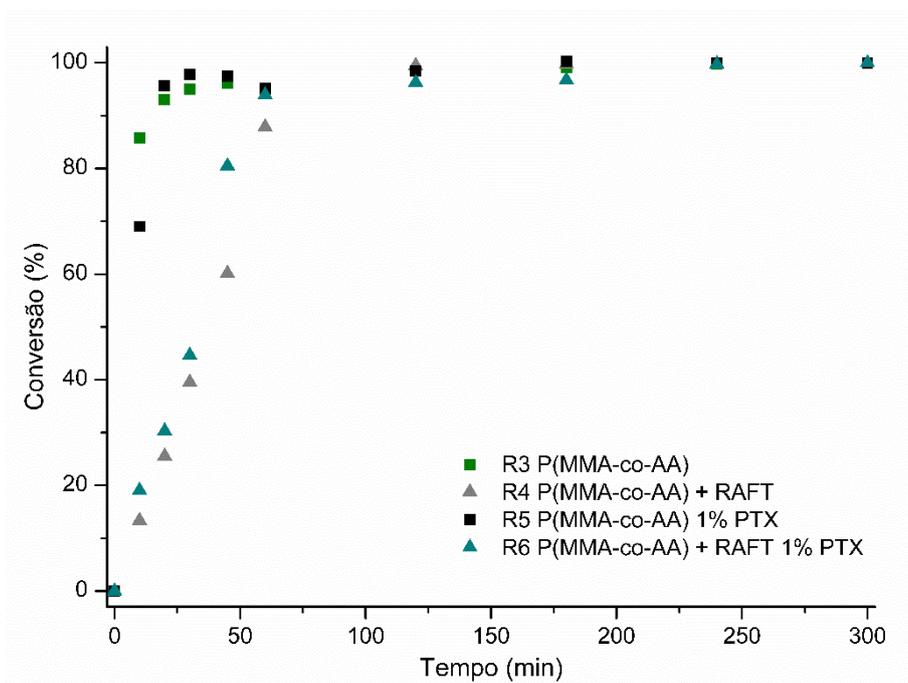


Figura 30 - Curvas de conversão das reações R3, R4, R5 e R6.

A Figura 31 mostra a evolução das conversão com o tempo para as copolimerizações realizadas na ausência do agente RAFT e a Figura 32 mostra a evolução da conversão nas reações conduzidas na presença do agente RAFT, ambas com diferentes quantidades do fármaco paclitaxel. Pode-se observar que o paclitaxel parece não exercer efeitos de inibição, a despeito dos grupos funcionais presentes, e que o aumento na quantidade de fármaco não afetou a dinâmica da reação.

A Figura 33 mostra as distribuições de massas molares das reações R1, R2, R3, R4, R5, R6, R11 e R12. Comparando-se as reações R1 e R2 com a reações R3 e R4, respectivamente, é possível observar que o acréscimo do comonômero AA levou a distribuições de massas molares mais largas que nas reações realizadas somente na presença de MMA. Pode-se perceber também que o acréscimo do comonômero AA não afetou o mecanismo do agente RAFT, uma vez que ocorreu o deslocamento esperado das curvas para maiores valores de massa molar com o avanço do tempo de reação. As curvas obtidas para as demais reações são apresentadas no APÊNDICE D.

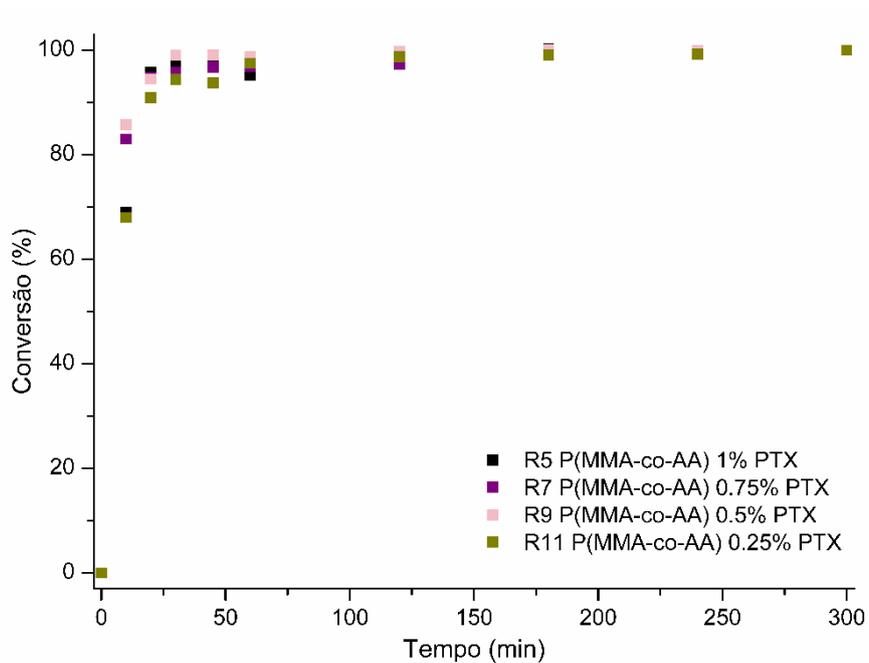


Figura 31 - Curvas de conversão das reações R5, R7, R9 e R11.

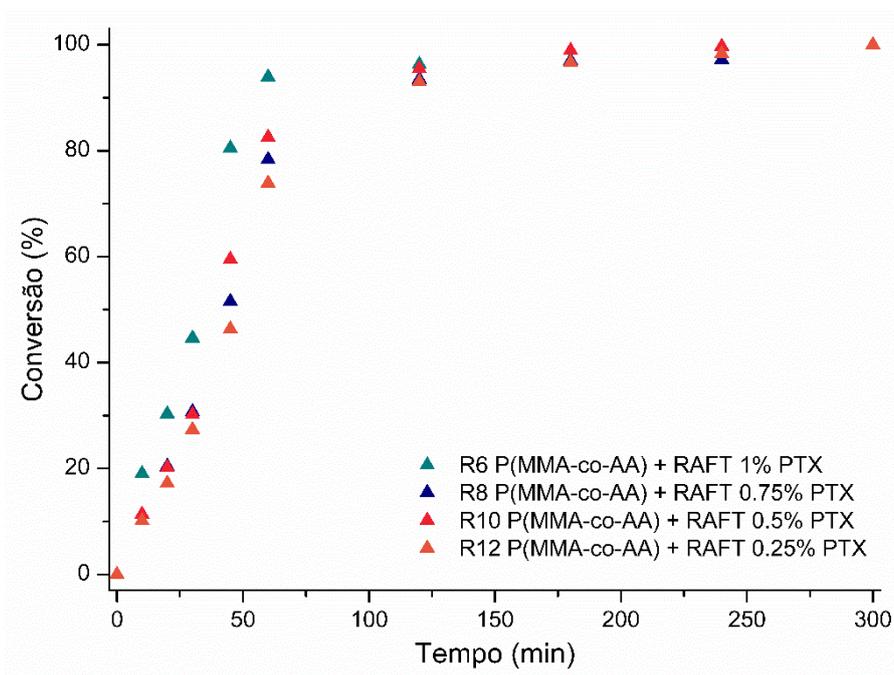


Figura 32 - Curvas de conversão das reações R6, R8, R10 e R12.

A Tabela 6 também apresenta os resultados de GPC dos produtos de R1 a R12 após 5 horas de reação. Como esperado, as massas molares numéricas das reações realizadas via polimerização convencional são até duas ordens de grandeza maiores do

que as massa molares dos produtos via polimerização radicalar RAFT, o que está relacionado aos diferentes mecanismos de reação. Além disso, para fins de comparação, foram calculadas as massas molares numéricas teóricas dos produtos das reações via RAFT com auxílio das Equações 10 e 11 (SVENSON & PRUD'HOMME, 2012).

$$Mn = \frac{[M]_0}{[RAFT]_0} * MM_{monômero} * \alpha + MM_{RAFT} \quad (10)$$

em que $[M]_0$ é a concentração molar inicial dos monômeros; $[RAFT]_0$ é a concentração molar inicial do agente RAFT; $MM_{monômero}$ é a massa molar do monômero; α é a conversão dos monômeros; MM_{RAFT} é a massa molar do agente RAFT.

É importante ressaltar que nas reações R4, R6, R8, R10 e R12, em que dois diferentes monômeros foram utilizados, a $MM_{monômero}$ foi calculada segundo a Equação 11.

$$\frac{1}{MM} = \frac{w}{MM_{MMA}} + \frac{(1-w)}{MM_{AA}} \quad (11)$$

em que MM é a massa molar média; w é a fração mássica; MM_{MMA} é a massa molar do MMA; e MM_{AA} é a massa molar do ácido acrílico.

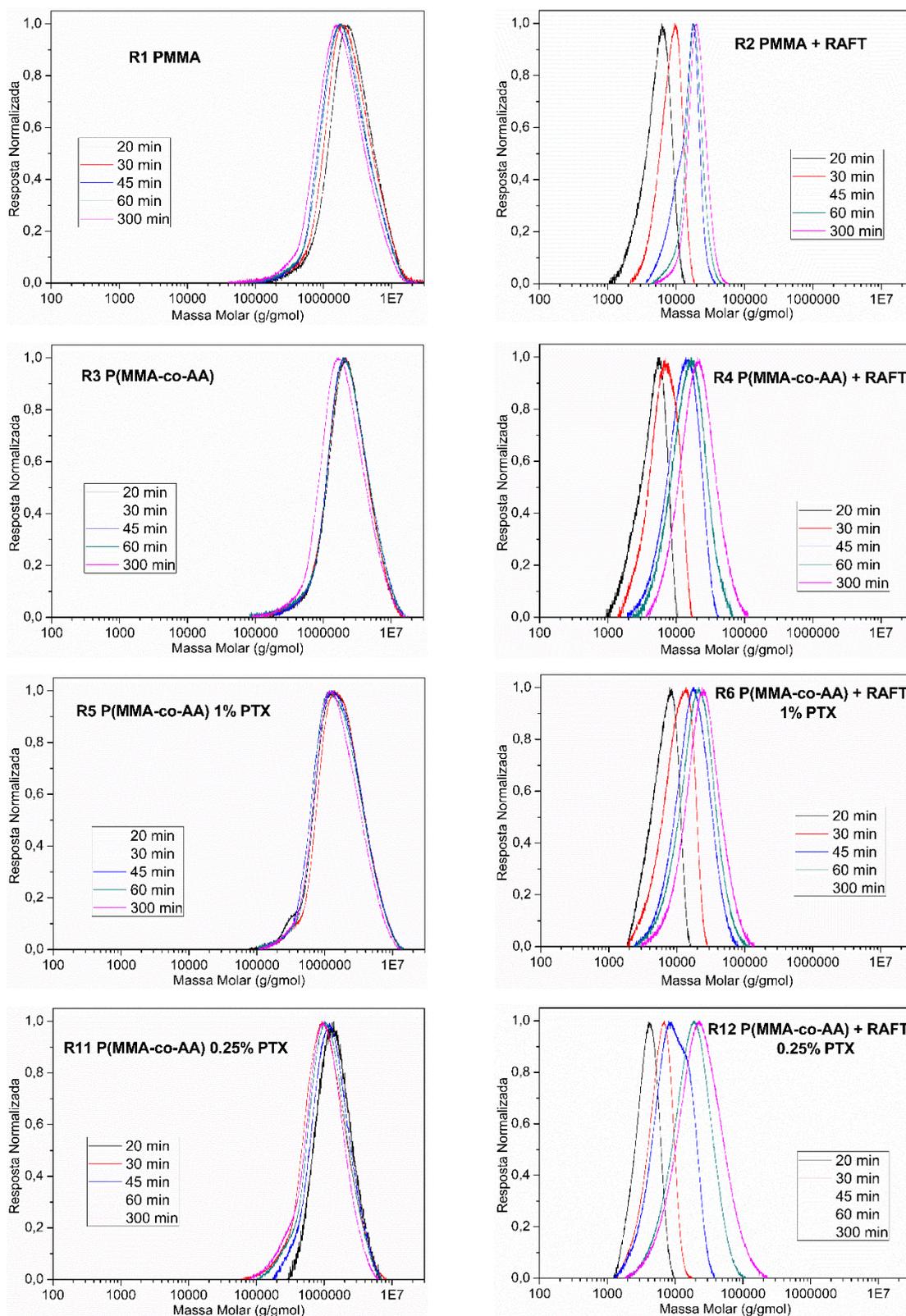


Figura 33 - Distribuição de massas molares das reações R1, R2, R3, R4, R5, R6, R11 e R12.

Tabela 6 - Resultados de massas molares numérica teórica e calculada e índices de polidispersão dos produtos após 5 horas de reação.

Reação	Mn teórico (g/gmol)	Mn (g/gmol)	IP
R1	-	$9,9 \cdot 10^5$	2,2
R2	$2,1 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	1,1
R3	-	$1,2 \cdot 10^6$	1,9
R4	$1,9 \cdot 10^4$	$1,65 \cdot 10^4$	1,4
R5	-	$1 \cdot 10^6$	1,8
R6	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	1,4
R7	-	$4,2 \cdot 10^5$	2,2
R8	$2,2 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	1,5
R9	-	$1,2 \cdot 10^6$	1,8
R10	$1,9 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$	1,5
R11	-	$6,5 \cdot 10^6$	1,7
R12	$2,2 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	1,6

Comparando-se as distribuições de massas molares dos produtos finais das reações R3 e R5, observa-se que a presença do fármaco não afetou o andamento da reação, apresentando massas molares médias e índices de polidispersão similares. O mesmo fato é observado quando se comparam as reações R4 e R6, uma vez que a presença do fármaco não afetou a dinâmica da reação RAFT, além de não ter alterado o índice de polidispersão, indicando que não há interação química do fármaco PTX no mecanismo da reação radicalar RAFT, seja como agente inibidor ou como agente de transferência de cadeia.

Pode-se observar também que as massas molares calculadas foram muito próximas às massas molares teóricas. Além disso, o índice de polidispersão foi menor em todos os casos em que o agente RAFT foi empregado em relação à reação de polimerização convencional correspondente, indicando que a adição do comonômero

e/ou do fármaco PTX não exerceu impacto negativo no curso das reações RAFT; caso contrário, o IP continuaria similar ao das respectivas reações convencionais. Além disso, a diminuição do IP indica que as reações RAFT foram bem sucedidas, no sentido de que foram capazes de controlar o crescimento das cadeias e, conseqüentemente, de estreitar a distribuição de massas molares do produto final, mesmo na presença do PTX.

4.2.2 Tamanho de partículas

A Tabela 7 apresenta os valores dos tamanhos das partículas obtidas após 5 horas de reação. Observa-se que, como já citado anteriormente, a presença do agente RAFT levou a partículas maiores do que nas reações radicalares convencionais, possivelmente em função da conversão do monômero ser mais lenta, levando à coalescência das gotas e degradação difusional. É importante ressaltar que a presença do comonômero AA e do fármaco PTX não afetou os tamanhos das partículas, tanto na ausência como na presença do agente RAFT, tampouco o aumento de concentração do fármaco, indicando a ausência de interação química entre eles.

Tabela 7 – Tamanhos médios das nanopartículas produzidas.

Reação	Tamanho de partícula (nm)	Reação	Tamanho de partícula (nm)
R1	63 ± 0,3	R7	74 ± 1,1
R2	105 ± 1,5	R8	127 ± 0,7
R3	70 ± 0,1	R9	70 ± 0,4
R4	128 ± 0,7	R10	136 ± 0,3
R5	74 ± 0,5	R11	70 ± 0,2
R6	124 ± 0,7	R12	136 ± 0,8

Reações de polimerização em miniemulsão têm como característica o fato de o tamanho de partículas permanecer constante do início ao fim da reação (ODIAN, 2014). Dessa maneira, é possível observar na Figura 34 que as distribuições de tamanhos de partículas ou permaneceram constantes ou sofreram um leve deslocamento para maiores tamanhos na presença do agente RAFT, corroborando a análise citada anteriormente e sendo esse mesmo efeito observado por FRANCO (2010) na polimerização de estireno na presença de agente RAFT. As curvas obtidas para as demais reações são apresentadas no APÊNDICE B.

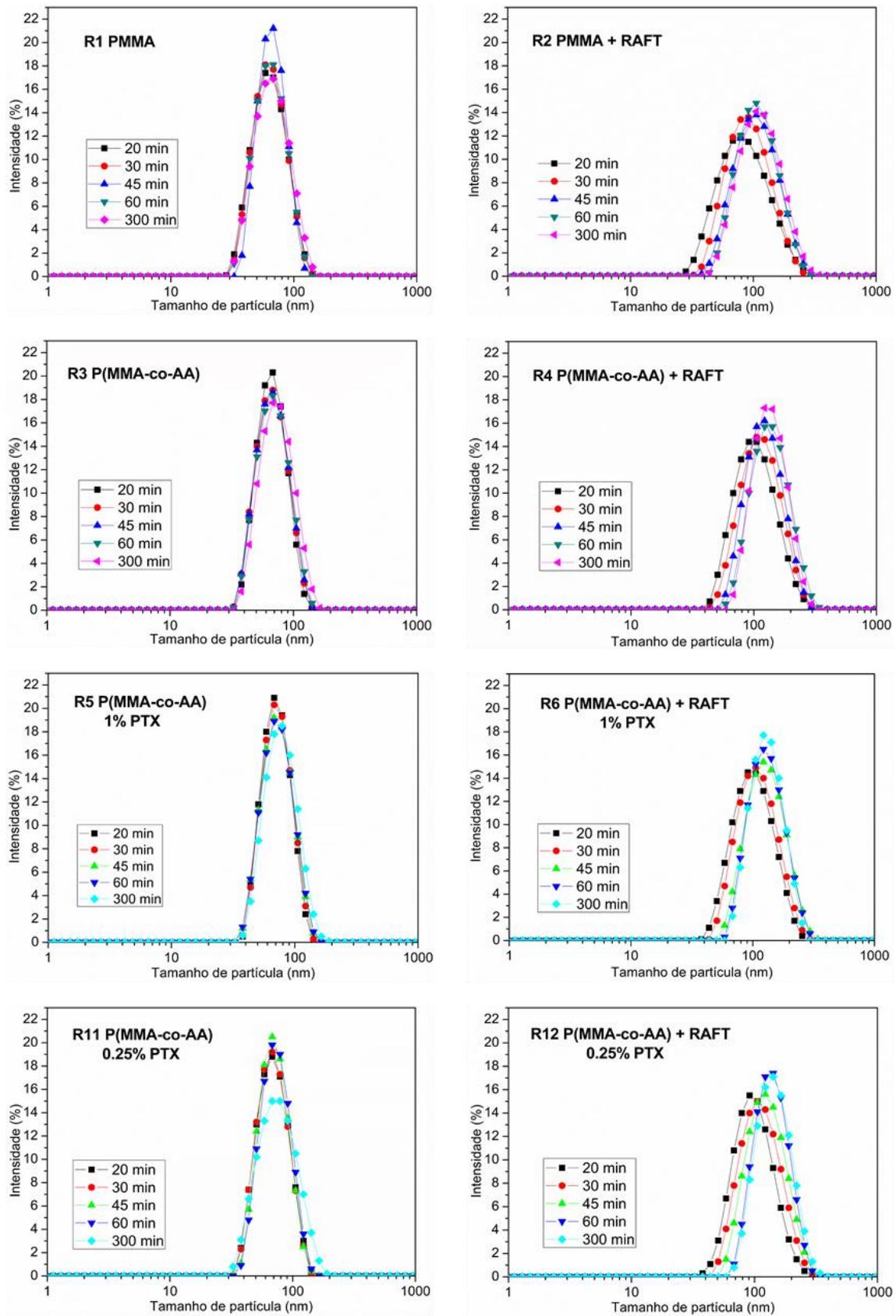


Figura 34 - Distribuição de tamanhos de partícula das reações R1, R2, R3, R4, R5, R6, R11 e R12.

4.2.3 Análises térmicas

Os resultados das análises térmicas de TGA das amostras contendo o fármaco possibilitaram comparar o material em termos de temperatura de degradação, em relação às nanopartículas que não o continham. Apresentam-se na Figura 35 os termogramas de TGA para as amostras contendo paclitaxel. Os perfis de degradação dos materiais que continham paclitaxel encapsulado foram semelhantes aos obtidos para o copolímero, tanto na ausência como na presença do agente RAFT. Portanto, a adição do fármaco não parece ter afetado a estabilidade térmica do produto final.

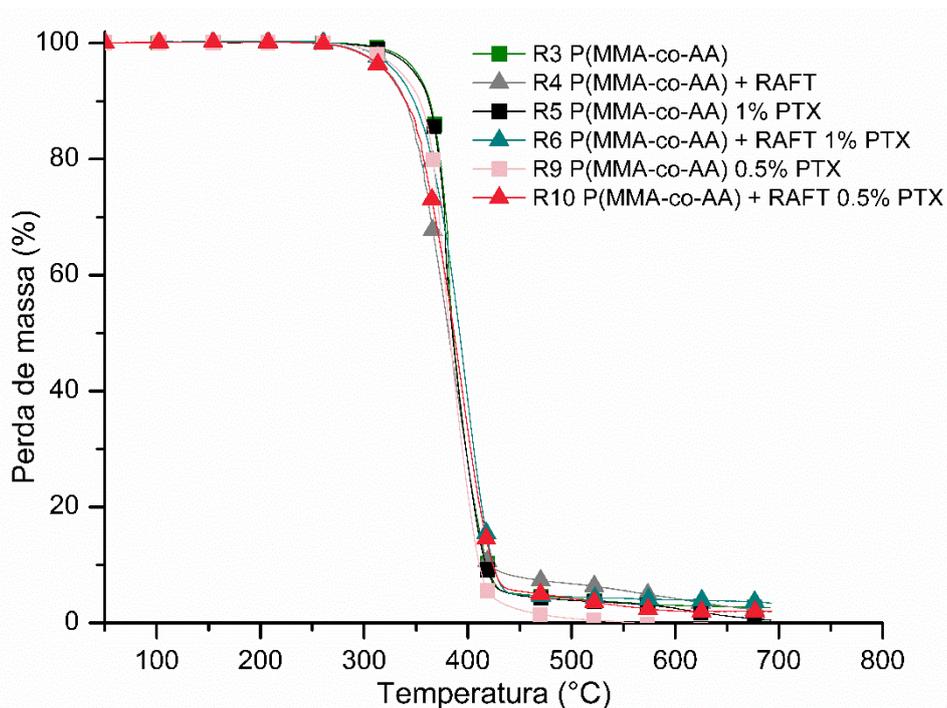


Figura 35 - Termogramas de TGA das amostras obtidas ao final das reações R3, R4, R5, R6, R9 e R10.

Realizaram-se ensaios de DSC, analisando apenas a primeira etapa de aquecimento das amostras, para avaliação do encapsulamento do fármaco e de possíveis interações com o polímero, como mostrado na Figura 36. A curva de DSC do paclitaxel mostra um pico endotérmico em 220 °C, que corresponde à temperatura de

fusão do fármaco. Para a mistura física das nanopartículas com o paclitaxel, na razão de 1:1, verifica-se o pico de fusão do fármaco na mesma temperatura de 220 °C, como esperado, uma vez que o fármaco se encontra como uma fase segregada. A curva obtida para as nanopartículas não apresentou qualquer evento térmico relevante nessa região. A despeito das baixas concentrações de PTX, o não aparecimento do pico endotérmico do paclitaxel pode ser atribuído ao aprisionamento e dispersão das moléculas do fármaco nas nanopartículas, evitando a formação de cristais na superfície. Dessa forma, pode-se admitir que o fármaco se encontra encapsulado e homogeneamente disperso na matriz polimérica.

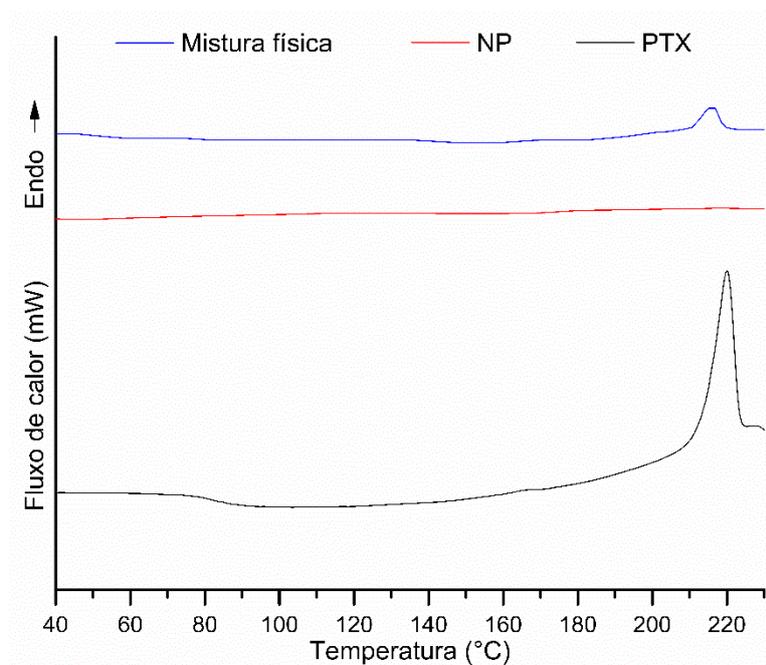


Figura 36 - Termogramas de DSC para avaliação de interação do fármaco paclitaxel com a matriz polimérica.

4.2.4 Eficiência de encapsulamento

Os cálculos dos teores de paclitaxel associados às nanopartículas foram realizados a partir de análises de HPLC pela técnica direta, com extração em solvente. Na Figura 37 são apresentados os cromatogramas obtidos após a injeção do paclitaxel

solubilizado em ACN, na concentração de 100 µg/mL, e para os polímeros obtidos na presença e na ausência do agente RAFT, também dissolvidos em ACN na mesma concentração, nas condições estabelecidas pelo método.

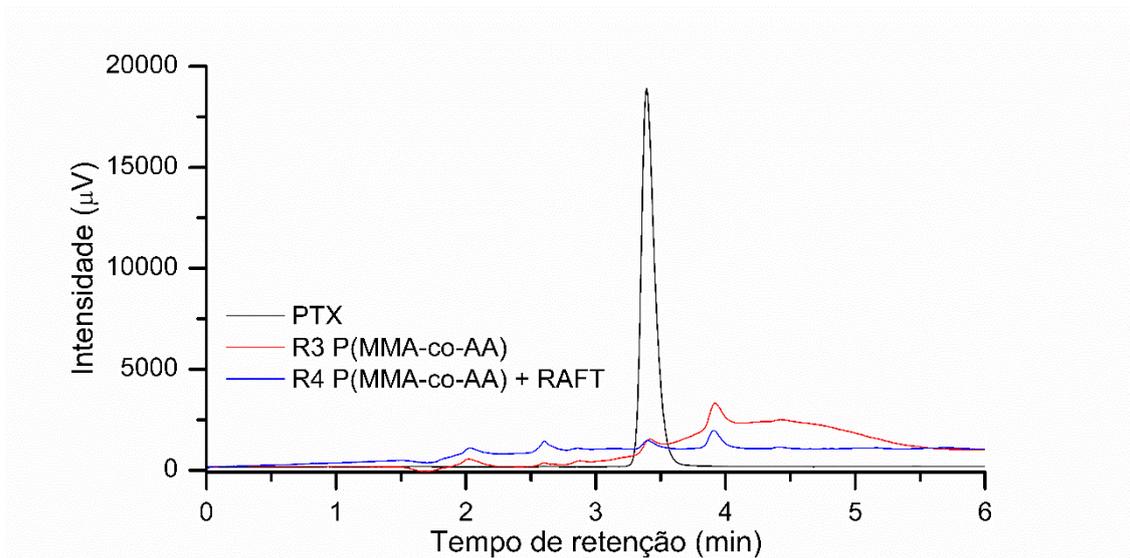


Figura 37 - Cromatogramas de HPLC do PTX, e produtos das reações R3 e R4 em ACN.

O método proposto apresentou-se linear para toda faixa de concentrações (5 a 100 µg/mL), como definido pela 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 distintas. Na Figura 38 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 $R^2 = 0,997$. 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 os cálculos das concentrações do paclitaxel nos cálculos de eficiência de encapsulamento.

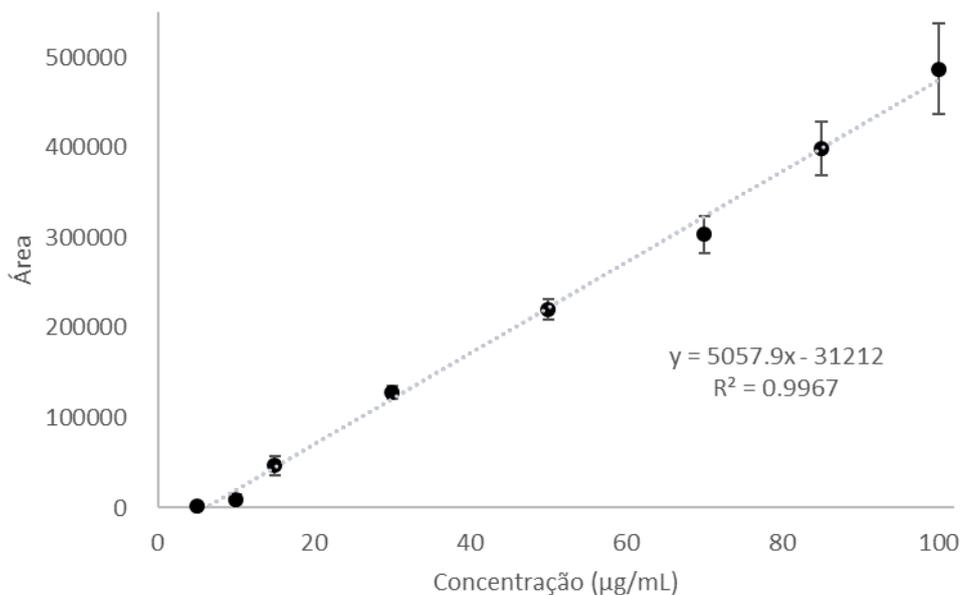


Figura 38 - Curva de calibração da técnica de HPLC.

As análises foram realizadas em triplicata para as reações R5, R6, R9 e R10, sendo o resultado dessas reações reportados como uma média dessas tréplicas, seguidas pelos desvios padrões, como mostrado na Tabela 8. Os ensaios também foram realizados para as demais reações.

Tabela 8 - Eficiência de encapsulamento.

Reação	Eficiência de encapsulamento (%)	Reação	Eficiência de encapsulamento (%)
R5	81,1 ± 7,7	R9	97,1 ± 3,2
R6	99,2 ± 4,6	R10	89,5 ± 6,6
R7	98,1	R11	94,6
R8	95,3	R12	98,3

Os resultados mostraram elevada eficiência de encapsulamento, o que já era esperado devido à hidrofobicidade do fármaco utilizado. Pode-se observar que a presença do agente RAFT nas reações R6, R8, R10 e R12 não afetou a eficiência de

encapsulamento do fármaco, tampouco o aumento da concentração do fármaco no meio reacional. Dessa forma, pode-se admitir que o ativo é completamente dissolvido nos monômeros MMA e AA, evitando-se que haja perda de eficiência de encapsulamento.

4.3 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Os ensaios de liberação foram realizados em solução tampão de PBS, pH 7,4, contendo 3% de Tween 80, simulando o pH do corpo humano. Com o intuito de analisar o efeito do agente RAFT no perfil de liberação do PTX, os ensaios foram realizados com os polímeros na presença e na ausência do agente RAFT. A Figura 39 mostra os cromatogramas dos ensaios de liberação nos tempos de 8 e 96 h, realizados com os polímeros R9 e R5, respectivamente, na ausência do agente RAFT. Pode-se observar a ausência de pico no tempo 3,4 minutos, característico do fármaco PTX, tanto para 8 quanto para 96 horas. A Figura 40 mostra os cromatogramas dos ensaios de liberação nos tempos de 4 e 96 h, realizados com os polímeros R8 e R10, respectivamente, na presença do agente RAFT. Novamente, pode-se observar a ausência de pico no tempo 3,4 minutos, característico do fármaco PTX, em ambos cromatogramas. Sendo assim, pode-se afirmar que não foi observada liberação do fármaco nestes ensaios. Tais resultados indicam a natureza não porosa das nanopartículas de P(MMA-co-AA), sugerindo que o processo de liberação seja controlado pela difusão do PTX através da matriz polimérica, além de refletirem a baixa solubilidade do PTX no meio aquoso.

Em contrapartida, RAJAE e FARZI (2016), estudaram o encapsulamento do PTX em nanopartículas P(MMA-co-AA), em que observaram uma liberação próxima a 60% nesse mesmo tempo em nanopartículas de aproximadamente 30 nm. Dessa forma, os resultados indicam que as partículas apresentam uma resistência difusional muito significativa, impedindo a liberação do fármaco. Portanto, esses resultados mostram que as distribuições de tamanho podem ser importantes, como esperados em sistemas controlados pela difusão.

WANG *et al.* (2015) estudaram o encapsulamento do fármaco PTX, pelo método de evaporação por solvente, nos polímeros poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(ácido lático-co-etileno glicol) (PELA). O trabalho reportou liberações de 10, 25 e 40%, em 96 horas, e 25, 70 e 75% para 22 dias para os polímeros PLA, PLGA e PELA, respectivamente, indicando que quanto maior a hidrofobicidade do polímero, menor é a liberação do fármaco. Isso sugere que a liberação foi controlada principalmente pela degradação do polímero.

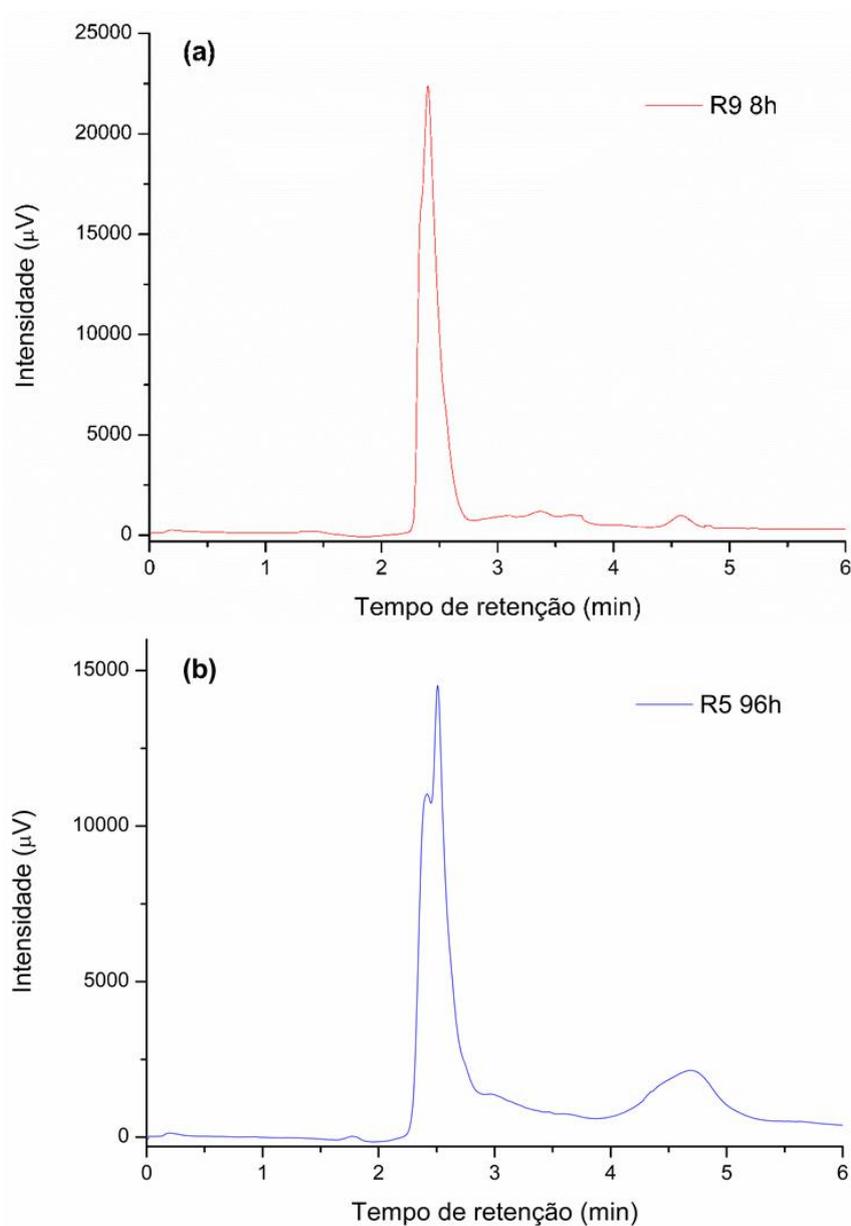


Figura 39 - (a) Cromatograma de HPLC para ensaio de liberação do polímero R9, 8h; (b) cromatograma de HPLC para ensaio de liberação do polímero R5, 96h.

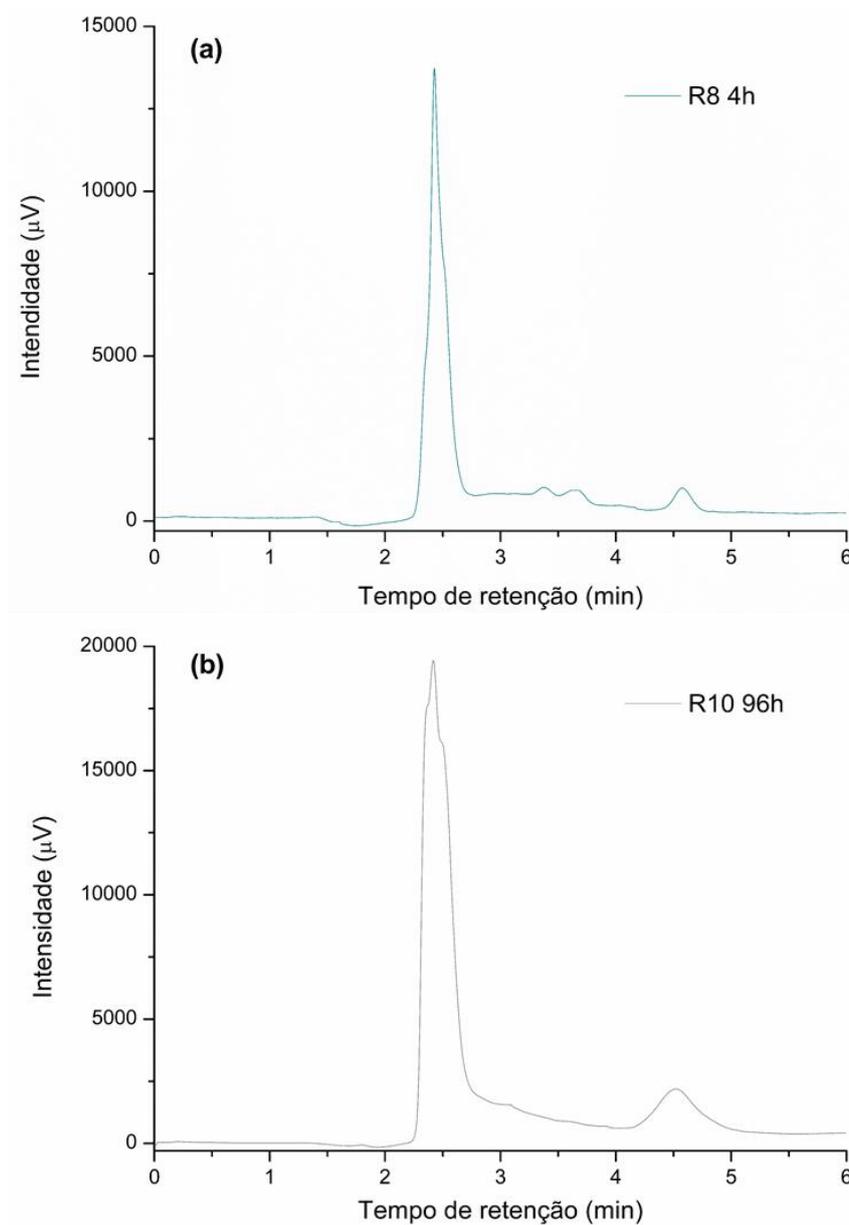


Figura 40 - (a) Cromatograma de HPLC para ensaio de liberação do polímero R8, 4h; (b) cromatograma de HPLC para ensaio de liberação do polímero R10, 96h.

4.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

No presente capítulo foram apresentados e discutidos os resultados obtidos acerca das nanopartículas poliméricas produzidas, do homopolímero de PMMA e do copolímero com AA, via polimerização radicalar convencional e radicalar RAFT. Inicialmente estudaram-se diferentes proporções de fase orgânica e aquosa para avaliar

as propriedades das nanopartículas produzidas. Os resultados mostraram que as reações conduzidas com 80 % de fase aquosa apresentaram tamanhos de partículas menores frente às produzidas com 90 % de fase aquosa, sendo mais satisfatória para o posterior encapsulamento do fármaco paclitaxel. Após este estudo preliminar, o encapsulamento do fármaco foi realizado, sendo necessário realizar a adição do monômero AA para solubilização do paclitaxel. As reações realizadas na presença do agente RAFT não tiveram a cinética de conversão de monômero e de massas molares afetadas, indicando a ausência de interação química entre o agente RAFT e o fármaco. No que diz respeito às eficiências de encapsulamento, os resultados indicaram elevadas incorporações do fármaco; porém, não foi observada liberação do fármaco após 96 h de teste, indicando que o processo difusivo na matriz polimérica controla as taxas de liberação do fármaco.

A despeito disso, os resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram adequados para dar prosseguimento aos testes de bioconjugação das nanopartículas produzidas, uma vez que as nanopartículas produzidas apresentaram tamanhos de partículas e massa molares apropriados para este fim.

CAPÍTULO V

MATERIAIS E MÉTODOS – BIOCONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados na segunda parte deste trabalho são descritos a seguir. Com exceção da água, os reagentes usados não foram previamente purificados, sendo usados diretamente como recebidos.

- Ácido etilenoamino tetracético (EDTA), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99% em massa;
- Dimetil sulfóxido (DMSO) da marca Nuclear (Brasil) com pureza mínima de 99% em massa;
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com 98% de pureza em massa;
- Fosfato de potássio dibásico (K_2PO_4), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com 98,5% de pureza em massa;
- Borohidreto de sódio (NaBH_4), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com 99% de pureza em massa;
- Isotiocianato de rodamina B da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) foi adquirido como uma mistura de isômeros;
- Maleimida-PEG-NHS Mw 5000 da marca NanoCS (Cheshire, Reino Unido), com pureza mínima de 99% em massa;
- Ácido clorídrico, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com 37,0% de concentração em água, usado no ajuste de pH;

- Hidróxido de sódio, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com 98,0% de pureza em massa, usado no ajuste de pH;
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, fornecido pela Sigma-Aldrich (Missouri, EUA), com pureza mínima de 98% em massa, usado no preparo do Reagente Ellman;
- Cloridrato de cisteína anidro, fornecido pela Sigma-Aldrich (Missouri, EUA), com pureza mínima de 98% em massa.
- Dimetil sulfóxido (DMSO) da marca Nuclear (Brasil) com pureza mínima de 99 % em massa;
- Aminoácido Lisina com 98% de pureza mínima, fornecido pela Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), usada como molécula modelo para adsorção;
- Glutationa com 98% de pureza mínima, fornecido pela Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), usada como molécula modelo para adsorção;
- Sal de sódio de insulina humana com 98% de pureza mínima, da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), usada como molécula modelo para adsorção.

Todos os experimentos foram realizados com água ultra pura (Milli-Q).

5.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Os equipamentos e acessórios utilizados durante as reações de bioconjugação do polímero estão discriminados abaixo.

- pHmetro – GEHAKA, modelo PG 1800 (São Paulo, Brasil);
- Pipetas automáticas de 20, 200, 1000 e 5000 µL – EPPENDORF;
- Centrífuga – Thermo Scientific, modelo 16R (Massachusetts, EUA);
- Agitador Roto-Shaker – SCIENTIFIC INDUSTRIES, modelo Roto-Shake Genie (Nova Iorque, EUA);
- Espectrofotômetro de ultravioleta – Shimadzu, modelo UV2401PC (Quioto, Japão).

- Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) – Thermo Scientific (Massachusetts, EUA), modelo Nicolet 6700, equipado com acessório Smart Orbit;
- Citômetro de fluxo (Becton & Dickinson, modelo FACS Clibur, EUA);
- Espectrofotômetro UV-VIS – A&E Laboratory Instruments (São Paulo, Brasil), modelo UV 1803);
- Espectrofotômetro UV-VIS para microplacas – ThermoScientific (Massachusetts, EUA), modelo Multiskan GO.

5.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Os experimentos da segunda parte deste trabalho foram conduzidos utilizando os polímeros R2 (PMMA + RAFT) e R4 (P(MMA-co-AA) + RAFT), obtidos na primeira etapa do estudo, a fim de comparar a influência da presença dos grupos carbonílicos no monômero AA.

5.3.1 Redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT em tiol

Utilizou-se no presente trabalho uma adaptação do método descrito por ZELIKIN e colaboradores (2007) para funcionalização das partículas. 500 mg do látex foram inicialmente diluídos em 5 mL de água purificada. Adicionaram-se 0,189 g de borohidreto de sódio (NaBH_4 com concentração aproximadamente igual a 1 M) a esta solução para a reduzir o grupo tiocarbonila do agente RAFT a tiol. Colocou-se esta solução sob agitação no *shaker* por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 85 μL de ácido clorídrico concentrado para neutralizar o excesso de NaBH_4 . Adicionaram-se então 0,087 g de fosfato de potássio dibásico para tamponar o meio (concentração final de 0,1 M). A Figura 41 apresenta o esquema do procedimento

experimental adotado para melhor entendimento e a Figura 42 apresenta o esquema reacional de redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT a tiol.

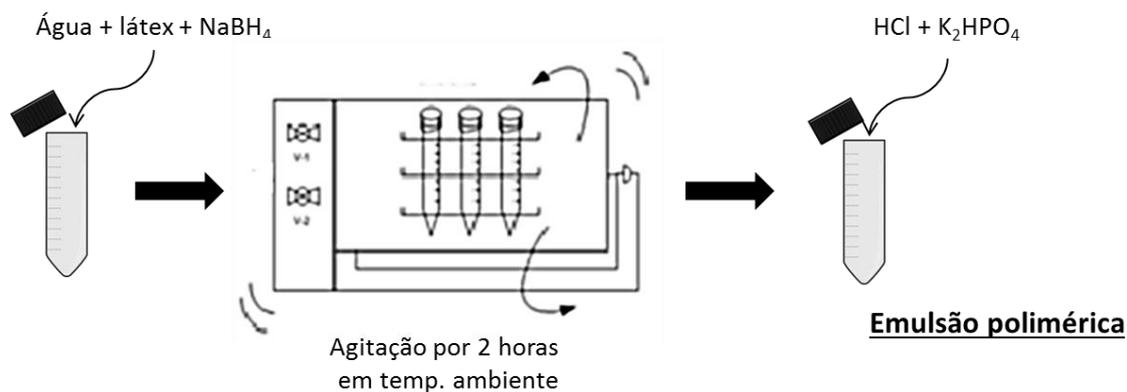


Figura 41 - Esquema do procedimento experimental utilizado para redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT a tiol.

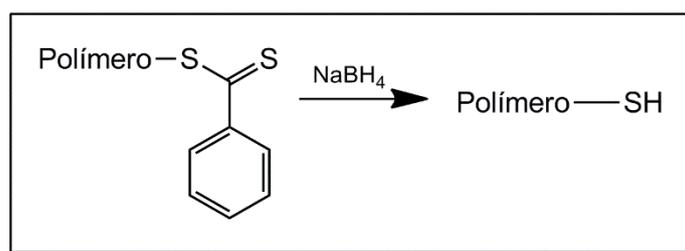


Figura 42 - Esquema reacional de redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT a tiol.

5.3.2 Quantificação da concentração de grupos tiol disponíveis

A quantificação de grupamentos tiol livres é comumente realizada empregando-se o reagente de Ellman (ELLMAN, 1959; THERMO SCIENTIFIC, 2017). A técnica baseia no fato de que o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico), também conhecido como reagente Ellman ou DTNB, reage com grupamentos sulfidríla, liberando uma molécula de uma substância cromogênica, 5-sulfeto-2-nitrobenzoato, chamado também de TNB. A coloração amarela intensa produzida pelo ânion TNB pode ser medida por absorvância a 412 nm (em pH 8). Como cada grupo sulfidríla presente gera uma

molécula de TNB por molécula de reagente Ellman, pode-se realizar uma quantificação da quantidade de grupos sulfidrilas livres (HERMANSON, 2008). Para isso, é necessário preparar uma curva de calibração com cloridrato de cisteína. A Figura 43 mostra a reação de redução do reagente Ellman.

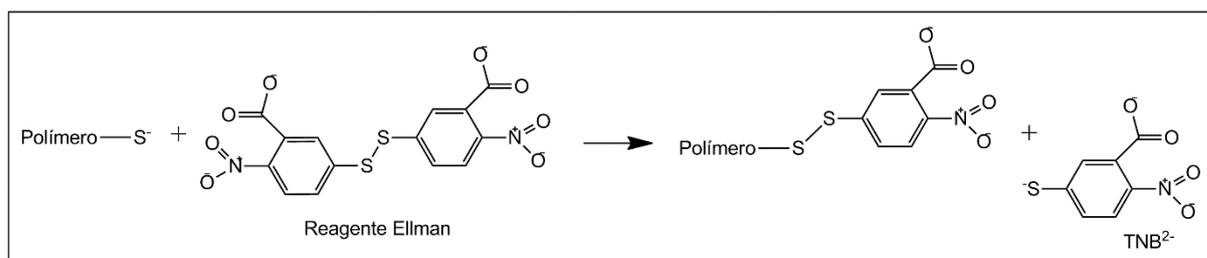


Figura 43 - Esquema ilustrativo da reação de redução do reagente Ellman.

Para a construção da curva de calibração, primeiro foi preparada uma solução tampão de 0,1 M de fosfato de sódio pH 8,0 contendo 1mM de EDTA. Em seguida, foram preparadas as soluções indicadas na Tabela 9. A solução do reagente Ellman foi preparada solubilizando 4 mg do ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) em 1 mL do tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo EDTA.

Por fim, a 250 μ L de cada amostra indicada na Tabela 9 foram adicionados a 2,5 mL da solução tampão e 50 mL da solução de Ellman. As misturas foram agitadas e incubadas por 15 minutos e em seguida foram medidas as absorvâncias das amostras no comprimento de onda de 412 nm.

Para promover a redução das ligações dissulfeto dos polímeros produzidos por polimerização RAFT e assim permitir a quantificação dos grupamentos tiol livres e a bioconjugação, a 250 mL da emulsão polimérica obtida anteriormente, com pH ajustado para 8,0 com HCl (1 M) ou NaOH (40%), foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio, com pH 8,0 contendo EDTA, e 50 mL da solução de Ellman. Essa mistura foi agitada e incubada por 15 minutos e em seguida submetida a análise em espectrofotômetro a 412 nm. A Figura 44 mostra o esquema do procedimento

experimental utilizado nesta etapa. A concentração de grupos tiol disponíveis foi calculada por meio da comparação com uma curva padrão de cloridrato de cisteína (cys-HCl).

Tabela 9 - Amostras preparadas para construção da curva de calibração com cloridrato de cisteína.

Tubo	Conc. (mmol/L)	Vol. padrão (mL)	Vol. tampão (mL)
1	1,5	1	-
2	1,25	1	0,2
3	1,0	1	0,5
4	0,75	1	1
5	0,5	1	2
6	0,25	1	5

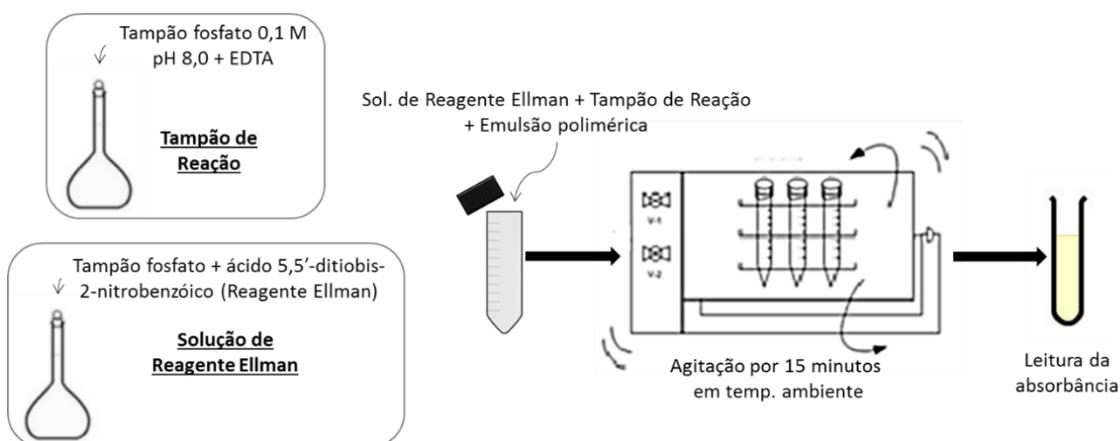


Figura 44 - Esquema utilizado na etapa de quantificação da concentração de grupos tiol disponíveis.

5.3.3 Imobilização das biomoléculas

Para a etapa de imobilização das biomoléculas, uma solução aquosa com pH 5,5 (ajustado com ácido clorídrico) de 10 mg/mL de maleimida-PEG-NHS MW 5000 foi preparada. 30 µL desta solução foram adicionados imediatamente após o preparo a 50 µL da emulsão polimérica final resultante do processo de redução dos grupos sulfidrilas.

Os Eppendorfs foram colocados em *shaker* a 25 °C a 100 rpm por 30 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 35 µL de uma solução da 10 mg/mL das biomoléculas (lisina, glutatona ou insulina, separadamente).

As amostras preparadas foram incubadas sob agitação em estufa a 37 °C e 100 rpm por 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos a 15 °C. O sobrenadante foi removido e reservado. O polímero foi lavado com três frações de 100 µL de água e centrifugado novamente. A primeira fração foi adicionada ao sobrenadante e as outras foram descartadas. A Figura 45 mostra o esquema do procedimento experimental que foi utilizado nesta etapa. A Figura 46 apresenta o esquema reacional de imobilização da biomolécula.

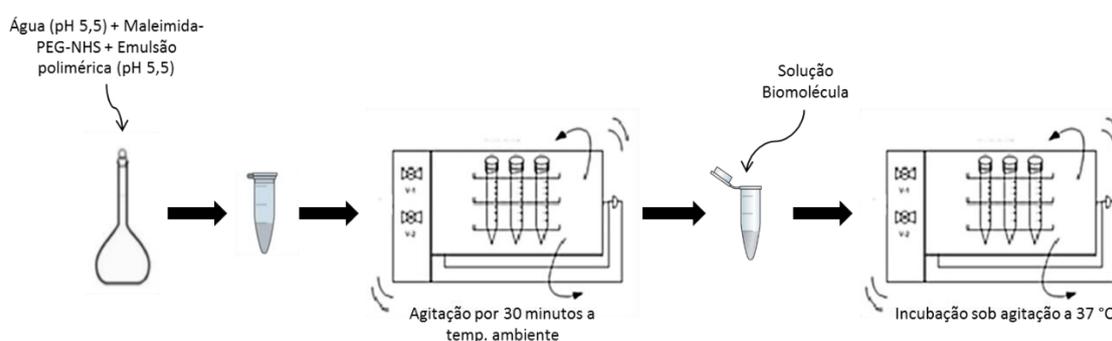


Figura 45 - Esquema experimental utilizado na etapa de imobilização das biomoléculas.

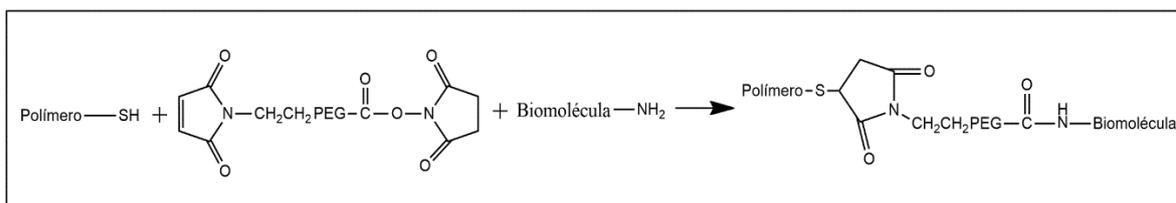


Figura 46 - Esquema ilustrativo das etapas de imobilização da biomolécula.

5.3.4 Avaliação da eficiência de bioconjugação

A quantificação da massa biomolécula imobilizada nas partículas foi feita por meio de um balanço de massa, após dosagem da biomolécula livre no filtrado por meio do ensaio de BRADFORD (BRADFORD, 1976), para os testes com glutatona e insulina. 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. Para os testes com lisina, a quantificação foi feita por meio do ensaio com o reagente o-ftaldialdeído (OPA) (VIGO *et al.*, 1992). 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. A reação é monitorada 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 F.

Com o objetivo de verificar a formação da ligação química após o ensaio de funcionalização, realizou-se análise de FTIR após secagem de uma das amostras em estufa de recirculação. Esta análise foi realizada somente para o ligante lisina, em função de os ligantes glutatona e insulina já possuírem a função amida em sua estrutura. A análise de infravermelho foi realizada na região do infravermelho médio (4000 – 400 cm^{-1}) com resolução de 4 cm^{-1} no espectrofotômetro FTIR (Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, Massachusetts – EUA) equipado com acessório Smart Orbit. O espectro foi registrado como resultado da média de 128 varreduras. A medida foi feita diretamente na fase sólida, usando um dispositivo de refletância atenuada (ATR).

5.3.5 Ensaios de captação celular

Com o objetivo de observar a captação celular de nanopartículas de polímeros biocunjugadas à lisina, glutationa e insulina, realizou-se a marcação com Rodamina B, uma molécula fluorescente. Para isso, preparou-se uma solução de 10 µg/µL de Rodamina B em DMSO. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de tampão bicarbonato 0,1 M e pH 9,0 e 75 µL da solução de Rodamina B ao polímero bioconjugado. O material foi incubado em *shaker* a 25 °C e 100 rpm durante 1 h e em seguida lavado e centrifugado 3 vezes com a solução tampão de bicarbonato pH 9,0. O produto final foi mantido refrigerado suspenso em solução tampão bicarbonato 0,1 M pH 9,0.

Para o ensaio de captação celular, macrófagos da linhagem RAW 267.4 de camundongo foram cultivados em meio DMEM *high glucose* enriquecido com 10% soro fetal bovino em tampão fosfato salino (PBS) e expostos às nanopartículas bioconjugadas e revestidas com Rodamina B. O sistema foi incubado por 3 h em frasco de cultura celular a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para retirada de células mortas. Em seguida, as células que permaneceram na superfície dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico e transferidas para tampão com 10% de soro fetal bovino em PBS em tubos de citometria, colocadas em gelo e registradas imediatamente em FACS Calibur (BD, Franklin Lakes, USA). Foram registradas 100000 células por amostra em canal de fluorescência relativa FL3. A aquisição de macrófagos não expostos foi realizada para estipulação do *gate* positivo, que corresponde à população de interesse que é detectada ligada ao marcador fluorescente no citômetro.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS E DISCUSSÃO – BIOCONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

6.1 ENSAIO DE BIOCONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Foram realizados os ensaios de bioconjugação das nanopartículas utilizando lisina, glutatona e insulina como moléculas modelo, em função da diferença de tamanho dessas moléculas. Utilizou-se a técnica de ligação covalente, utilizando a maleimida-PEG-NHS para como molécula espaçadora.

6.1.1 Quantificação da concentração de grupos tiol disponíveis

A Figura 47 apresenta a curva de calibração obtida da relação linear entre as absorvâncias de TNB e as respectivas concentrações de sulfidrilas livres calculadas.

Para fins de comparação, o procedimento de quantificação conduzido com o reagente Ellman foi realizado na ausência de polímero, na presença dos látices das reações R1 (PMMA) e R3 (P(MMA-co-AA)), produzidos por polimerização radicalar convencional, e na presença dos látices das reações R2 (PMMA + RAFT) e R4 (P(MMA-co-AA) + RAFT), produzidos por polimerização radicalar RAFT. A Tabela 10 mostra as absorvâncias e concentrações de sulfidrilas livres, em mol/L, na amostra com ausência de polímero (branco) e nas amostras contendo os polímeros R1, R2, R3 e R4, respectivamente, pode-se perceber que tanto a amostra branco, que não continha polímero, quando as que continham os polímeros R1 e R3 não indicaram a presença de sulfidrilas livres, enquanto que para os polímeros R2 e R4 as concentrações de SH livre

foram de $1,21 \cdot 10^{-3}$ e $1,24 \cdot 10^{-3}$ mol/L, respectivamente, mostrando que o grupo terminal de cadeia, tiocarbonila, derivado da polimerização radicalar RAFT foi reduzido a tiol, podendo ser utilizado nas etapas posteriores de bioconjugação.

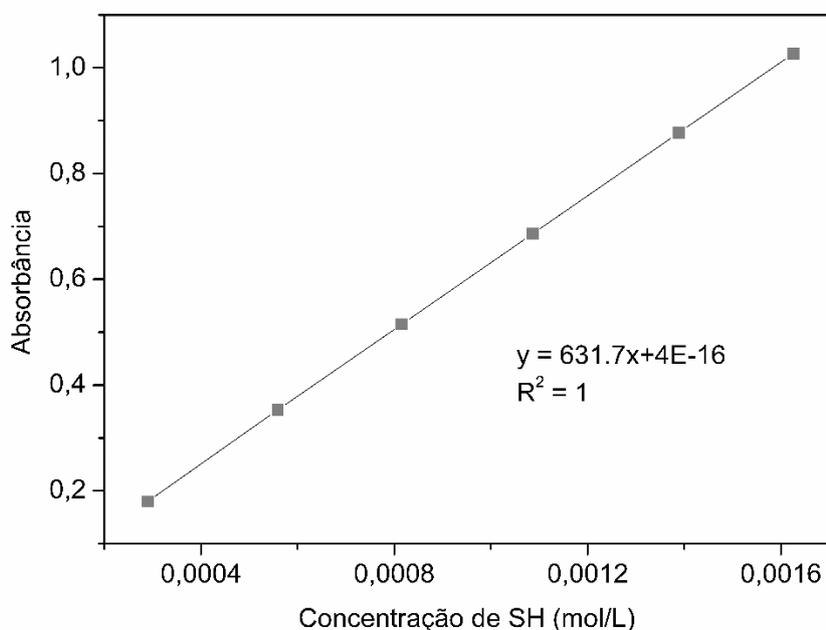


Figura 47 - Curva de calibração construída com o reagente Ellman.

Tabela 10 - Absorbância e concentração (mol/L) de sulfidril livre.

	Absorbância	Concentração de SH (mol/L)
Branco	0	$-6,33 \cdot 10^{-19}$
R1	0	$-6,33 \cdot 10^{-19}$
R2	0,762	$1,21 \cdot 10^{-3}$
R3	0	$-6,33 \cdot 10^{-19}$
R4	0,783	$1,24 \cdot 10^{-3}$

6.1.2 Imobilização das biomoléculas

A funcionalização das nanopartículas com as biomoléculas modelo (lisina, glutatona e insulina) foi realizada por meio de uma ligação covalente entre o grupo

terminal do agente RAFT com o espaçador maleimida-PEG-NHS, e este com o grupo amino terminal das biomoléculas. A escolha dessas biomoléculas se deu pela diferença de massas molares entre elas, sendo a lisina a que apresenta menor massa molar e a insulina a que apresenta maior massa molar. A definição da massa inicial de biomolécula utilizada nos ensaios foi baseada nos resultados reportados por PEIXOTO (2013) e MOREIRA (2015).

Foram realizados testes para as amostras do polímero R2 (PMMA + RAFT) e do copolímero R4 (P(MMA-co-AA + RAFT), possibilitando a comparação dos valores obtidos. A quantificação do aminoácido lisina por meio do ensaio utilizando o reagente OPA mostrou que o polímero R2 possibilitou a imobilização de cerca de 77% da lisina utilizada, enquanto o copolímero R4 permitiu a imobilização de 90% da lisina utilizada, como mostrado na Tabela 11. O resultado obtido para a amostra produzida com AA foi maior, o que sugere que os tipos de grupos funcionais presentes na estrutura do polímero interferem na afinidade pela reação e adsorção, que também podem ser promovidas pela presença dos grupos carbonílicos do AA (PEIXOTO, 2013; STANKEVICH *et al.*, 2017).

Tabela 11 - Resultados de eficiência de bioconjugação para as reações conduzidas com o reagente maleimida-PEG-NHS

Amostra	Eficiência de bioconjugação
R2 + Lisina	77%
R4 + Lisina	90%
R2 + Glutaciona	99%
R4 + Glutaciona	100%
R2 + Insulina	96%
R4 + Insulina	94%

As quantificações das massas das biomoléculas glutatona e insulina adsorvidas e/ou quimicamente ligadas a cada sistema foram realizadas pelo método de BRADFORD. Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que as eficiências de bioconjugação foram altíssimas, independente do polímero conter ou não grupos ácidos disponíveis.

Com o intuito de verificar a formação da ligação covalente pela rota química sugerida, foi realizado ensaio de FTIR no ensaio de imobilização da lisina nas nanopartículas de PMMA, comparando-se a amostra inicial do polímero e após a imobilização do aminoácido. A análise foi feita por comparação dos espectros obtidos e a diferenciação de picos característicos. Na Tabela 12 é apresentado um resumo das principais informações fornecidas pela técnica de FTIR para a imobilização de biomoléculas nas nanopartículas (PAVIA *et al.*, 2009).

Tabela 12 - 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 da ligação 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

Inicialmente, apresenta-se na Figura 48 o espectro de FTIR do aminoácido lisina, biomolécula modelo em estudo, em que é possível verificar as bandas características dos grupos funcionais amino e ácido carboxílico, pertencente à estrutura da lisina, em 1570 cm^{-1} , referente à deformação angular do NH_2 proveniente do grupo amino, e 2925 cm^{-1} , referente ao estiramento OH de grupos ácido carboxílico (PAVIA *et al.*, 2009)..

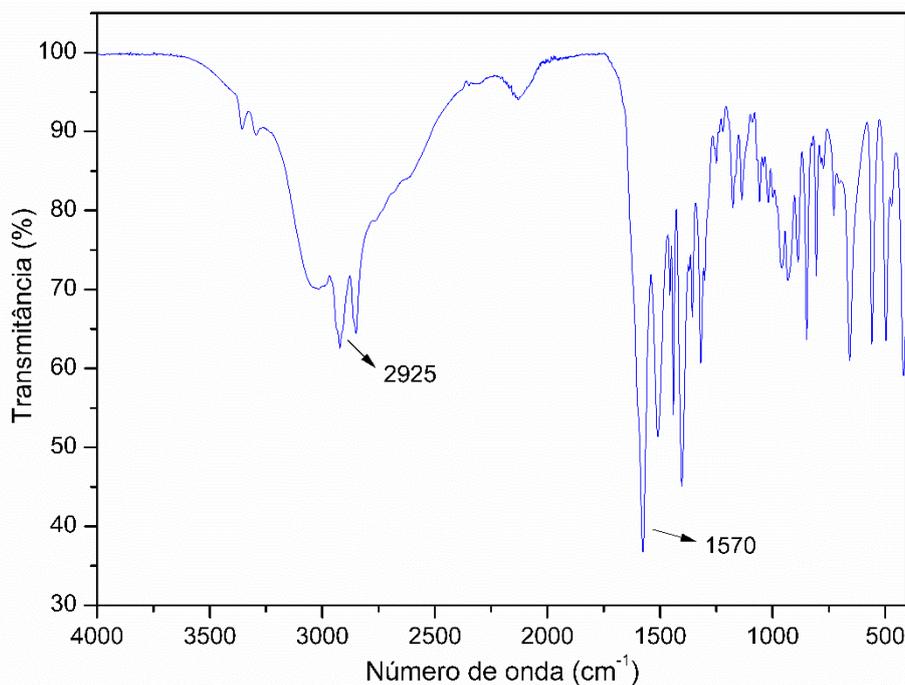


Figura 48 - Espectro de FTIR do aminoácido lisina.

O espectro de FTIR obtido após o ensaio de imobilização da lisina nas nanopartículas de PMMA é apresentado na Figura 49. A avaliação foi realizada com base na comparação das amostras e diferenciação dos picos característicos. A partir destes espectros, verifica-se a existência de um pico intenso em 1720 cm^{-1} , característico da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) proveniente do polímero inicial, que contém o grupo éster. O pico em 1136 cm^{-1} pode ser atribuído às ligações $\text{C}-\text{O}$, também presentes no éster. Para a amostra funcionalizada, foi possível notar o pico em 1611 cm^{-1} , característico da ligação amida (PAVIA *et al.*, 2009), o que sugere que a lisina foi covalentemente ligada às nanopartículas a partir da rota proposta.

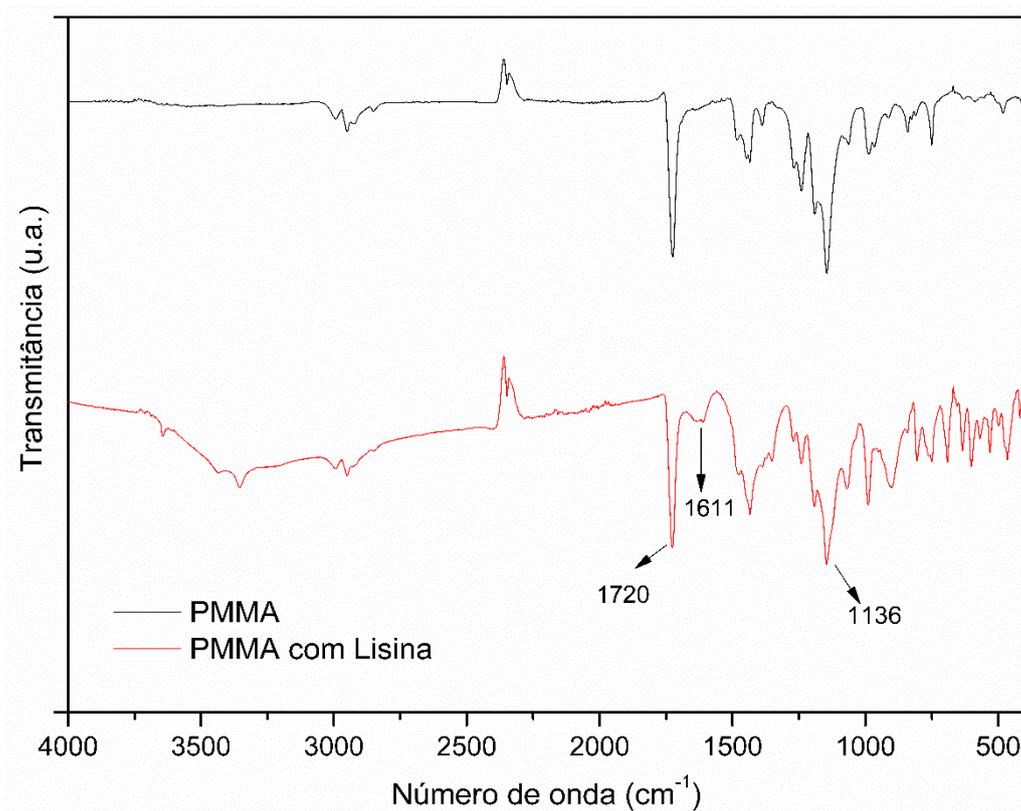


Figura 49 - Espectro de FTIR das nanopartículas (R2) antes e após o ensaio de imobilização com lisina.

Optou-se por apresentar também os dados de transmitância do copolímero conjugado à biomolécula em comparação com a transmitância do copolímero puro. De modo geral, acredita-se que quanto mais similar for o espectro em relação ao do PMMA, mais linear estarão os dados e, portanto, maior será o coeficiente de correlação.

Todavia, como ilustrado na Figura 50, é nítida a diferença entre as transmitâncias avaliadas, resultando num coeficiente de correlação igual a 0,4, que sugere que a composição do polímero após a bioconjugação com o aminoácido lisina foi significativamente diferente da composição do PMMA, indicando que houve mudança na estrutura do material polimérico. Desse modo, esse resultado parece indicar que a lisina foi covalentemente ligada às nanopartículas a partir da rota proposta.

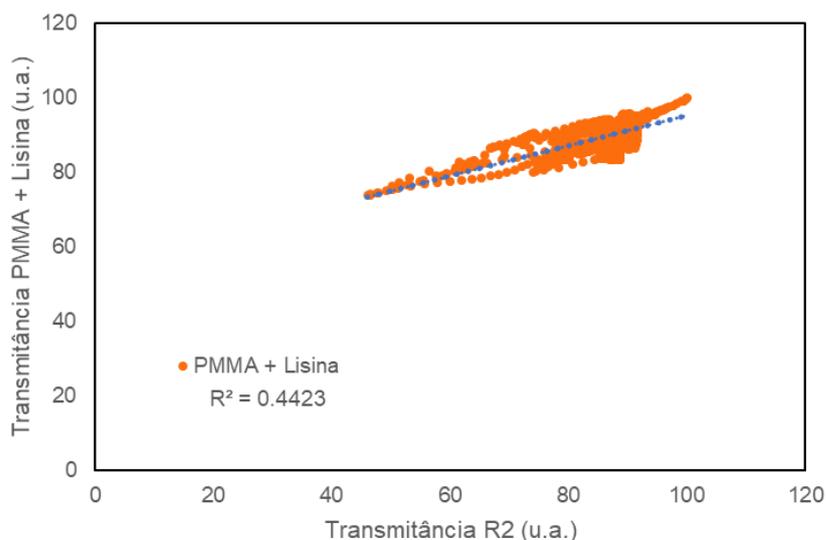


Figura 50 - Comparação entre as transmitâncias do PMMA e do PMMA conjugado à biomolécula lisina.

A avaliação por meio do ensaio de FTIR foi realizado somente para a biomolécula lisina uma vez que a biomolécula glutatona já possui o grupamento amida em sua estrutura, e a biomolécula insulina se trata de uma proteína de alta massa molar cujos grupos ativos podem estar envolvidos em interações de outra natureza, devido à complexa formação da molécula, dificultando a confirmação da ligação covalente entre a biomolécula e o polímero por meio da rota química proposta.

Outros trabalhos do grupo EngePol também estudaram a imobilização de biomoléculas na superfície de partículas poliméricas. SANTOS (2014) estudou a produção de micropartículas poliméricas de poli(acetato de vinila (PVAc) e de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PVAc-co-PMMA) para a imobilização por adsorção de L-asparaginase, albumina do soro bovino (BSA) e lisozima, observando que a enzima lisozima manteve sua atividade após o processo de adsorção. CAMPOS-RAMOS (2018) estudou a produção de nanopartículas de PMMA, P(MMA-co-AA) e poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) (P(MMA-co-MAA)) para imobilização das biomoléculas lisina, BSA e *trans-activating transcriptor* (TAT) por meio da rota química EDC. WAY e colaboradores (2019) imobilizaram BSA em nanopartículas de PMMA,

P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-MAA), produzidas por polimerização RAFT, utilizando a maleimida como ligante obtendo até 93% de eficiência de bioconjugação.

Os resultados nas análises de captação celular são apresentados na Figura 51. Pode-se observar que parece haver preferência por parte dos macrófagos pelas nanopartículas bioconjugadas à biomolécula insulina, com captação de 96% das nanopartículas, frente a glutathiona e a lisina que resultaram em captações respectivamente iguais a 30% e 4%, levando a sugerir que quanto maior é a massa molar da biomolécula bioconjugada ao polímero, maior é a capacidade de captação pelas células.

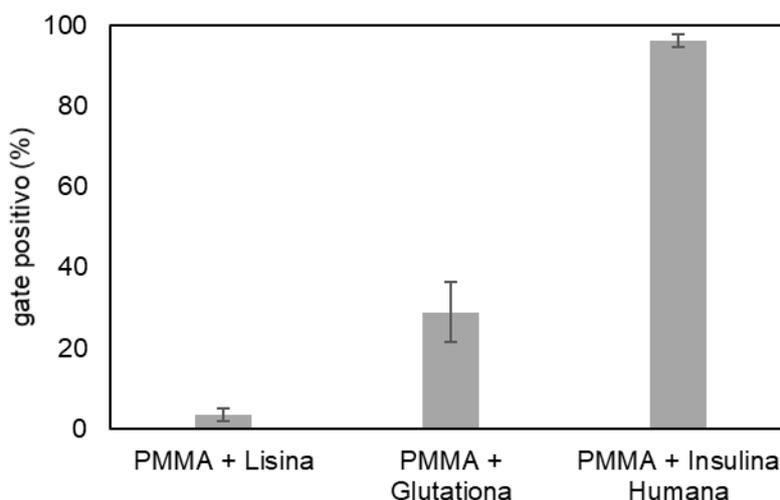


Figura 51 - Ensaio de captação celular.

Vale ressaltar que os macrófagos são empregados nesse trabalho apenas como modelo celular e que, portanto, o efeito descrito como benéfico está relacionado ao fato de que há interesse em que as nanopartículas sejam internalizadas quando células tumorais mais específicas forem estudadas. No entanto, a captação excessiva pelos macrófagos não constitui necessariamente uma vantagem porque, caso o sistema bioconjugado seja captado pelos macrófagos, a atuação poderá ser inespecífica, uma vez que os macrófagos estão presentes na corrente sanguínea e têm a importante

função de fagocitar antígenos (corpos estranhos) e removê-los do organismo (FARMER e DIETERT; 2013).

6.2 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O presente capítulo apresentou os resultados obtidos durante os ensaios de funcionalização das nanopartículas. A redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT a tiol permitiu a conjugação da molécula maleimida-PEG-NHS e, posteriormente, via reação química, de diferentes biomoléculas sobre a superfície das nanopartículas poliméricas. A formação da ligação amida entre a molécula ligante e a biomolécula modelo lisina foi evidenciada pela análise de FTIR. Os ensaios de captação celular mostraram que os macrófagos internalizaram as nanopartículas e que quanto maior foi a massa molar da biomolécula conjugada à nanopartícula, maior foi a captação celular por parte dos macrófagos.

CAPÍTULO VII

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de doutorado propôs o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas produzidas por polimerização em miniemulsão via RAFT para o encapsulamento do fármaco PTX e a bioconjugação dessas nanopartículas a três diferentes biomoléculas.

Visando ao cumprimento dos objetivos propostos neste trabalho: (i) selecionou-se o polímero para encapsulamento do fármaco, garantindo a manutenção da atividade; (ii) escolheu-se a técnica de polimerização, visando a utilizar uma técnica simples e que não faz uso de solventes orgânicos; (iii) avaliaram-se as melhores condições da reação de polimerização, para obter partículas com distribuição de tamanhos e propriedades adequadas à funcionalização; e (iv) avaliou-se a liberação do fármaco.

Na primeira etapa do trabalho, a polimerização em miniemulsão foi a técnica escolhida para a produção das partículas poliméricas, uma vez que permite o encapsulamento de agentes terapêuticos durante a reação, com altas eficiências. Foram estudadas as reações de polimerização do monômero metacrilato de metila e copolimerização com ácido acrílico, na presença e na ausência do agente RAFT. Na ausência do agente RAFT, as reações apresentaram cinética rápida, como previsto para sistemas de reações por radicais livres convencionais, e altas conversões. Os materiais produzidos apresentaram massas molares em torno de 2200 kDa e diâmetros médios que variaram entre 60 e 70 nm. Na presença do agente RAFT, as reações apresentaram uma cinética mais lenta, como esperado para sistemas de polimerização via RAFT, e altas conversões. Os materiais produzidos apresentaram massa molares em torno de

23 kDa, que foram crescendo gradativamente com a conversão até alcançar estes valores, e diâmetros médios que variaram entre 100 e 130 nm. Estes polímeros foram posteriormente utilizados em reações de bioconjugação. Os maiores diâmetros obtidos nas polimerizações RAFT indicam a ocorrência de coalescência ou degradação difusional ao longo da reação.

As nanopartículas produzidas na presença do fármaco paclitaxel apresentaram características semelhantes às demais, tanto na ausência como na presença do agente RAFT, indicando que o fármaco e o agente RAFT não interagiram quimicamente. As características obtidas pelos sistemas são desejáveis para a aplicação pretendida, tornando-as aptas para o transporte de fármaco no organismo. Além disso, o paclitaxel foi encapsulado no sistema polimérico com eficiências superiores a 90 %.

Os testes de liberação do fármaco foram realizados em sistemas que simulavam as condições de temperatura e pH do organismo. Contudo, os resultados obtidos mostraram que o paclitaxel não foi liberado das nanopartículas do copolímero de P(MMA-co-AA) em 96 h de teste, indicando uma forte resistência difusional, dificultando a liberação do fármaco, ou fortes limitações termodinâmicas, dado que o fármaco não é solúvel em água. No entanto, com base nos dados do HPLC, pode-se afirmar que o fármaco está livre e disperso na matriz polimérica.

Na segunda etapa do trabalho foram estudadas reações de bioconjugação das nanopartículas produzidas via polimerização RAFT a três diferentes biomoléculas (lisina, glutatona e insulina), por meio do grupamento tiol do agente RAFT e da molécula espaçadora maleimida-PEG-NHS. Os resultados mostraram que a bioconjugação do aminoácido lisina foi ligado à superfície das partículas com formação de ligações químicas do tipo amida, confirmadas por espectroscopia FTIR. Além disso, a eficiência de bioconjugação, para as três biomoléculas, foram muito altas e superiores a 90%. Os ensaios de captação celular com macrófagos indicaram uma maior internalização das nanopartículas conjugadas à insulina, que foram as biomoléculas de maior peso molecular, seguida daquelas conjugadas à glutatona e da lisina, indicando que, quanto

maior é a massa molar da biomolécula conjugada, maior é a taxa de captação pelos macrófagos.

7.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Produzir um sistema à base de nanopartículas eficiente e seguro constitui um desafio científico e tecnológico, de maneira que a pesquisa nesta área é extremamente importante. Cada trabalho representa mais um passo no avanço científico. Algumas sugestões para continuação da pesquisa e trabalhos futuros são citadas a seguir:

- Em relação ao perfil de liberação do fármaco, os resultados mostraram que durante o tempo de teste avaliado o fármaco contido na matriz polimérica não foi extraído para o meio de liberação. Sugere-se que estes testes sejam realizados por períodos prolongados em novos meios de liberação, a fim de traçar um perfil cinético apropriado para a liberação e aplicação.
- Seria interessante avaliar a produção de nanopartículas com diferentes estruturas poliméricas, com adição de grupos sensíveis a estímulos, como temperatura e pH, a fim de favorecer a difusão das moléculas de fármaco e a liberação, além de avaliar a liberação do fármaco em meios mantidos em condições similares, de temperatura e pressão, às dos tumores neoplásicos de interesse.
- Caracterizar as micropartículas sintetizadas por microscopia acoplada a Raman, de modo a identificar a distribuição do paclitaxel na partícula.
- Avaliar a presença de monômero residual nas nanopartículas poliméricas, de modo a complementar as caracterizações realizadas, avaliando a toxicidade dos materiais finais.
- Com relação à reação de bioconjugação com a molécula ligante maleimida-PEG-NHS, é importante conduzir um estudo com outras biomoléculas mais específicas

para a vetorização para tumores e avaliar a eficiência dos sistemas com células cancerosas.

Vale ressaltar, portanto, que ainda há muito a ser estudado acerca desse tema, que é muito rico e apresenta potencial de desenvolvimento constante.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMER, K. A.; TEW, G. N.; "RAFT polymerization of a novel activated ester monomer and conversion to a terpyridine-containing homopolymer". **Journal of Polymer Science, Part A -Polymer Chemistry**, v. 45, p. 5618-5625, 2007.

ABRIATA, J. P.; TURATTI, R. C.; LUIZ, M. T.; *et al.*; "Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles", **Materials Science and Engineering**, v. 96, p. 347-355, 2019.

ALLCOCK, H.R.; LAMPE, F.W.; "Contemporary Polymer Chemistry", 2nd ed.; Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1990.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; *et al.*; "Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução". **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALQAHTANI, F. Y.; ALEANIZY, F. S.; TAHIR, E. E.; *et al.*; "Paclitaxel". In: Profiles of drugs Substances, Excipients and Related Methodology, v. 44, 1 ed, chapter 3, London, EK, Elsevier Inc., 2019.

AMBROGI, P. M. N.; Polimerização de estireno em miniemulsão: monitoramento em linha usando espectroscopia de infravermelho próximo e Raman e modelagem matemática do processo. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2015. Tese.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; *et al.*; "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability". **Pharm Res.**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.; *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6ª edição. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

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

ARAÚJO, L.; SHEPPARD, M.; LÖBENBERG, R.; *et al.*; "Uptake of PMMA nanoparticles from gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and oil vehicles". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, p. 209 - 224, 1999.

ARAUJO, O.; GIUDICI, R.; SALDIVAR, E.; *et al.*; "Modeling and experimental studies of emulsion copolymerization systems". I. Experimental result. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, p. 2360, 2001.

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

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

AULTON, M. E.; "Delineamento de formas farmacêuticas", Artmed, Porto Alegre, 2005.

BARNER-KOWOLLIK, C.; "Handbook of RAFT Polymerization", Wiley-VCH, Sydney, 2008.

BARRIOS, J. G.; Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS. 2010. Dissertação.

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

BAUM, M.; BRITAIN, J.; “Synthesis of Polymer Brushes on Silicate Substrates via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Technique”. **Macromolecules**, v. 35, p. 610-615, 2002.

BAYS, E.; TAO, L.; CHANG, C.; *et al.*; “Synthesis of Semitelechelic Maleimide Poly(PEGA) for Protein Conjugation By RAFT Polymerization”. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1777-1781, 2009.

BENNET, D.; KIM, S.; “Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery” In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**, Chapter 8: Polymer, Publisher: InTech, Editors: Ali Demir Sezer, p.257-310, 2014.

BETTENCOURT, M.; ALMEIDA, A. J.; “Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery”, **Journal of Microencapsulation**, v. 29, p. 353-367, 2012.

BIASUTTI, J.D.; DAVIS, T.P.; LUCIEN, F.P.; *et al.*; “Reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization of methyl methacrylate in suspension”. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v.43, p. 2001, 2005.

BOYER, C.; STENZEL, M.H.; DAVIS, T.P.; “Bioapplications of RAFT polymerization.” **Chemical Reviews**, v.119 (11), p. 5402-5436, 2009.

BOYER, C.; STENZEL, M.H.; DAVIS, T.P.; "Building nanostructures using RAFT polymerization". **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 49, p 551-595, 2011.

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.

BRASIL JÚNIOR, A.G., Desenvolvimento de Processos de Bioconjugação Empregando Pontos Quânticos Fluorescentes de Semicondutores II-VI. UFPE, Recife, PE. 2010, Dissertação.

BRESSY, C.; NGO, V. G.; MARGAILLAN, A.; "A first insight into the thermal degradation mechanism of silylated methacrylic homopolymers synthesized via the RAFT process". **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, p. 115-121, 2013.

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

CAMPOS, E.; BRANQUINHO, J.; CARREIRA, A. S.; *et al.*; Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications". **European Polymer Journal**, v. 49, p. 2005-2021, 2013.

CAMPOS-RAMOS, I. M. F.; "Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central". Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2018.

CANALLE, L.A.; LÖWIK, D.W.P.M.; HEST, J.C.M. van; "Polypeptide-polymer bioconjugates". **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 329-353, 2010.

CANEVAROLO, S.V.; *Ciência dos Polímeros*, 2ªed., São Paulo, Artliber, 2006.

CAPEK, I.; "On inverse Miniemulsion polymerization of conventional water – soluble monomers". **Adv. Colloid. Interf. Science**, v. 156, p. 35-61, 2010.

CASTOR JR., C.; AZEVEDO, G.; SANTOS JR., J.; PIRES, L.; NELE, M.; PINTO, M.; PAIVA, T.; "PMMA-based biomedical applications: Manufacture and uses". In: **Advances in Medicine and Biology**. 1 ed. Nova Iorque: Nova Medicine & Health, v. 141, p. 97-167, 2019.

CHERN, C.S.; "Emulsion polymerization mechanisms and kinetics". **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 443 – 486, 2006.

CHIANG, P. C.; GOULD, S.; NANNINI, M.; QIN, A.; *et al.*; "Nanosuspension delivery of paclitaxel to xenograft mice can alter drug disposition and anti-tumor activity". **Nanoscale research letters**, v. 9, p. 156-165, 2014.

CHIEFARI, J.; CHONG, Y.K.; ERCOLE, F.; "Living Free Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer – The RAFT Process". **Macromolecules**, v. 31, p. 5559-5562, 1998.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; *et al.*; "Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer". **AACR, Clinical cancer Research**, v. 14, p. 1310-1316, 2008.

CHONG, Y. K.; KRSTINA, J.; LE, T. P. T.; *et al.*; "Thiocarbonylthio compounds [S:C(Ph)SR] in free radical polymerization with reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT polymerization). Role of the free-radical leaving group (R)". **Macromolecules**, v. 36, p. 2256–2272, 2003.

COSTA, M. L.; RESENDE, C. M.; PARDINI, L. C.; "Estudo da influência do diluente reativo PGE na cinética de cura de resina epóxi utilizada em compósitos estruturais". **Química Nova**, v. 23, p. 320-325, 2000.

CRESTEIL, T.; MONSARRAT, B.; DUBOIS, J.; *et al.*; "Regioselective Metabolism of Taxoids by Human CYP3A4 and 2C8: Structure-Activity Relationship". **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 438-445, 2002.

CUNNINGHAM, M.F.; "Living/controlled radical polymerizations in dispersed phase systems". **Progress in Polymer Sciences**, v. 27, p. 1039, 2002.

DA SILVA, F. M.; DE LACERDA, P. S. B.; JONES JUNIOR, J.; "Desenvolvimento sustentável química verde". **Química Nova**, v. 28, n. 1, pp. 103-110, 2005.

DAVIS, K.A.; MATYJASZEWSKI, K.; "Effect of (pseudo)halide initiators and copper complexes with non-halogen anions on the atom transfer radical polymerization". **Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry**, v. 41, p. 449-65, 2004.

DREW UNIVERSITY, 2014, "Zero-Order Controlled-Release Kinetics Through Polymer Matrices". Disponível em: <<http://www.drew.edu/wpcontent/uploads/sites/99/Team5.pdf>>. Acesso em: 07 de abril de 2016.

DUMITRIU, S., *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*, 2 ed., CRC Press, 2001.

DUNCAN, R.; "Polymer Conjugates for Tumour Targeting and Intracytoplasmic Delivery. The EPR Effect as a Common Gateway?". **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, p. 441-449, 1999.

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C.; **Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo. Artliber Editora Ltda, 2006.

ELLMAN, G. L.; "Tissue Sulfhydryl Groups". **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.

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.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H.; "The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of the Effect", **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 136-151, 2011.

FARMER, J. T.; DIETERT, R. R.; "Immunotoxicology Assessment in Drug Development". In: Faqi, A. L. (ed), *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, 2 ed, chapter 10, Massachusetts, USA, Academic Inc., 2016.

FENG M.; LI P.; "Amine-containing core-shell nanoparticles as potential drug carriers for intracellular delivery", **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 80, p. 184-193, 2006.

FEUSER, P. E.; GASPAR, P. C.; RICCI-JÚNIOR, E.; *et al.*; "Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) PMMA and evaluation of cytotoxicity for biomedical application". **Macromolecular Symposia**, v. 343, p. 65-69, 2014.

FONSECA, L. B.; NELE, M.; VOLPATO, *et al.*; "Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through "In Situ" Miniemulsion Polymerization" **Macromolecular Reaction Engineering**. v. 7, p. 54-63, 2013.

FORMAN, H.J.; RINNA, A.; ZHANG, H.; "Glithathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis". **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FRANCO, F. H.; Síntese de macro-agentes de transferência de cadeia do tipo PEO-RAFT e sua utilização na polimerização em miniemulsão do estireno. Dissertação. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2010.

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.

GALVAN, R.; LAURENCE, R.; TIRRELL, M.; *Polymerization Process Modeling*, 1 ed., WILEY-VHC, 1995.

GELDERBLOM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; et al.; “Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation”. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 1590-1598, 2001.

GEORGES, M.K.; VEREGIN, R.P.N.; KAZMAIER, P.M.; et al.; “Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process”. **Macromolecules**, v. 26, p. 2987, 1993.

GHARIEH, A.; KHOEE, S.; MAHDAVIAN, A. R.; “Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics”. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 269, p. 152-186, 2019.

GORINI, F.; CHIAPPA, E.; GARGANI, L.; et al.; “Potential effects of environmental chemical contamination in congenital heart disease”. **Pediatric Cardiology**, v. 35, n. 4, p. 559-568, 2014.

GRAÇA, D.; LOURO, H.; SANTOS, J.; et al.; “Toxicity screening of a novel poly(methyl methacrylate) – Eudragit nanocarrier on L929 fibroblasts”. **Toxicology Letters**, v. 276, p. 129-137, 2017.

HAMIDI, M., SHAHBAZI, M-A., ROSTAMIZADEH, K. “Copolymers: Efficient Carriers for Intelligent Nanoparticulate Drug Targeting and Gene Therapy”. **Macromolecular Journal –Macromolecular Bioscience Review**, v. 12, p. 144-164, 2012.

HARRIS, J. M.; KOZLOWSKI, A.; "Poly (ethylene glycol) and related polymers monosubstituted with propionic or butanoic acids and functional derivatives thereof for biotechnical applications", Patente n° US5672662 A, 1997.

HERK, A.M.; "Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation", Blackwell Publishing, 2008.

HECHT, L. L.; WAGNER, C.; LANDFESTER, K.; *et al.*; "Surfactant Concentration Regime in Miniemulsion Polymerization for the formation of MMA Nanodroplets by High-Pressure Homogenization". **Langmuir**, v. 27, p. 2279-2285, 2011.

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.; *et al.*; "Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells". **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 206, p. 2440-2449, 2005.

HUIZING, M. T.; MISSER, V. H.; PIETERS, R. C.; *et al.*; "Taxanes: a new class of antitumor agents". **Cancer Investigation**, v. 13, p. 381-404, 1995.

HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T.; "Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics." **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 107-142, 2001.

IBRAHIM, N. K.; DESAI, N.; LEGHA, S.; *et al.*; "Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel". **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1038-44, 2002.

ISHIGAKI, Y.; MORI, H.; "Synthesis of poly(chloroprene)-based block copolymers by RAFT-mediated emulsion polymerization". **Polymer**, v. 140, p. 198-207, 2018.

KANAGASABAPATH, S.; CLAVERIE, J.; UVILINA, I.; "Synthesis of well defined tridlock copolymer by reversible addition fragmentation chain transfer (raft) polymerization in emulsion", **American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry**, v.40, p.1080, 1999.

KAWAGUCHI, H.; "Functional polymer microspheres". **Process in Polymer Science**, v. 25, p. 1171-1210, 2000.

KIM, S.; KIM, J.H.; JEON, O.; *et al.*; "Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery". **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 71, p. 420-430, 2009.

KING, K.M.; "A history of insulin: from discovery to modern alternatives". **British Journal of Nursing**, v. 12, p. 1137-1141, 2003.

KINGSTON, D. G.; "Recent advances in the chemistry of taxol". **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 726-734, 2000.

KLOK, H. –A.; "Biological-Synthetic Hybrid Block Copolymers: Combining the Best from Two Worlds". **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 1-17, 2005.

KREUTER, J.; HEKMATARA, T.; DREIS, S.; *et al.*; "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.

LANDFESTER, K.; "Polyreactions in miniemulsions". **Macromolecular Rapid Communication**, v. 22, p. 896-936, 2001.

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

LANDFESTER, K.; WILLERT, M.; ANTONIETTI, M.; "Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions". **Macromolecules**, v. 33, p. 2370, 2000.

LEE, B.; YUN, Y.; PARK, K.; "Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities". **Chemical Engineering Science**, v. 125, PP. 1-7, 2014.

LENZI, M. K.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C.; "Modelagem da Polimerização Simultânea de Estireno em Suspensão e Emulsão". **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, p. 112-121, 2004.

LI, H.; BAPAT, A.P.; LI, M.; *et al.*; "Protein conjugation of thermoresponsive amine-reactive polymers prepared by RAFT". **Polymer Chemistry**, v. 2, p. 323-327, 2011.

LI, C.; WANG, J.; WANG, Y.; *et al.*; "Recent progress in drug delivery". **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2019.

LIM, M.S.; CHEN, H.; "Miniemulsion polymerization of styrene with a block copolymer surfactant". **Journal of Applied Polymer Science Part A: Polymeric Chemistry**, v. 38, p. 1818 - 1827, 2000.

LIU, S.Y.; HERMANSON, K.D.; KALER, E.W.; "Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization in Microemulsion". **Macromolecules**, v. 39, p. 4345, 2006.

LOPEZ, A.; CHEMTOB, A.; MILTON, J. L.; *et al.*; "Miniemulsification of monomer-resin hybrid systems", **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 6289-6297, 2008.

LORCA, B. S. S.; BESSA, E. S.; NELE, M.; *et al.*; "Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization." **Macromolecular Symposia**. v. 319, p. 246-250, 2012.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C.; Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica, Rio de Janeiro, E-papers, 2001.

MAEDA, H.; BHARATE, G.Y.; DARUWALLA, J.; “Polymeric Drugs for Efficient Tumor-targeted Delivery Based on EPR-Effect”, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p. 409-419, 2009.

MAEDA, H.; SAWAA, T; KONNOB, T., “Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical q overview of the prototype polymeric drug SMANCS”, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 74, p. 47-61, 2001.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; *et al.*; “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review”, **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 271–284, 2000.

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 Released**, v. 161, p. 164-174, 2012.

MALIK, S.; CUSIDÓ, R.M.; MIRJALILI, M.H.; *et al.*; “Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review”. **Process Biochemi**, v. 46, p. 23-34, 2011.

MANO, E.B.; **Introdução A Polímeros**, 2 ed. São Paulo, Edgard Blücher LTDA, 1999.

MARCUCCI, F.; LEFOULON, F.; “Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress”. **Research focus – Reviews**, v. 9, p. 219-228, 2004.

MARK, H. F.; **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, v. 3, 3 ed. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc, 2002.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; *et al.*; "Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications". **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191-200, 2014.

MARUPUDI, N. I.; HAN, J. E.; LI, K. W.; *et al.*; "Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies". **Expert opinion on drug safety**, v. 6, p. 609-621, 2007.

MATYJASZEWSKI, K.; DAVIS, T. P.; "Handbook of Radical Polymerizations", John Wiley & Sons, New York, 2002.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H.; "A New concept for macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor gent Smancs". **Cancer Research**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.

MC CLEMENTS, D. J.; "Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences, and similarities". **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MC CORMICK, C.L.; LOWE, A.B.; "Aqueous RAFT polymerization: recent development in synthesis of functional water-soluble polymers with controlled structures". **Accounts of Chemical Research**, v. 37, p. 312-325, 2004.

MENDES, A. N.; HUBBER, I.; SIQUEIRA, M.; *et al.*; "Preparation and cytotoxicity of poly(methyl methacrylate) nanoparticles for drug encapsulation". **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 34-40, 2012.

MICHA, J. P.; GOLDSTEIN, B. H.; BIRK, C. L.; *et al.*; "Abraxane in the treatment of ovarian cancer: the absence of hypersensitivity reactions". **Gynecologic Oncology**, v. 100, p. 437-438, 2006.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S.H.; "Living Radical Polymerization by the RAFT Process". **Australian Journal of Chemistry**, v. 58, p. 379, 2005.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S.H.; “Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A First Update”. **Austrian Journal of Chemistry**, v. 59, p.1669-692, 2006.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S.H.; “Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update”. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, p. 1402, 2009.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURAY, J. C.; “Long-Circulating and TargetSpecific Nanoparticles: Theory to Practice”. **Pharmacological Review**, v. 53, p. 283-318, 2001.

MORAES, C.M.; Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais. Dissertação. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MOREIRA, T.S.; Síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização radicalar (RAFT) para vetorização biodirigida de tamoxifeno. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MURPHY, E.A.; MAJETI, B.K.; MUKTHAVARAM, R.; *et al.*; “Targeted Nanogels: A Versatile Platform for Drug Delivery to Tumors”. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, p. 972-982, 2011.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T.; “Polymeric as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery”. In: Lee, K.; Kaplan, D. (Eds.), **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, Springer, Cap. 2, p. 252, New York, 2006.

NAKACHE, E.; POULAIN, N.; CANDAU, F.; “Biopolymer and Polymer Nanoparticle and their Biomedical Applications” In: *Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology*, Organics. **Polymers and Biological Materials**, Academy Press, v. 5, p. 537-635, 2000.

NGWULUKA, N.; “Application of *In Situ* Polymerization for Design and Development of Oral Drug Delivery Systems”. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1603-1611, 2010.

NICOLAS J.; MANTOVANI, G.; HADDLETON, D. M.; "Living Radical Polymerization as a Tool for the Synthesis of Polymer-Protein/Peptide Bioconjugates". **Macromolecular Journals: Macromolecular Rapid Communications**, v. 28, p. 1083-1111, 2007.

NYMAN, D. W.; CAMPBELL, K. J.; HERSH, E.; *et al.*; "Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies". **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 7785-7793, 2005.

ODIAN, G.G.; "Principles of Polymerization", John Wiley & Sons Publication, 4ª edição, New York, 2004.

OKABE, K.; KIMURA, H.; OKABE, J.; *et al.*; "Intraocular tissue distribution of betamethasone after administration using a non-biodegradable sustained drug delivery device". **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, n. 6, p. 2702-2707, 2003.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; *et al.*; "Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos". **Química Nova**. v. 27, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, M.A.M.; "Produção de micropartículas e nanopartículas poliméricas para aplicações biomédicas em sistemas heterogêneos de polimerização". Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011.

OLIVEIRA, M.A.M.; NELE, M.; PINTO, J.C.; "Polimerização RAFT em miniemulsão". **Polímeros**, v. 23, p. 784-794, 2013.

ORÉFICE, R. L.; VILLANOVA, J. C. O.; "Aplicações Farmacêuticas de Polímeros". **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

PAIVA, T.; MELO JR, P.; PINTO, J. C.; “Comparative Analysis of Sunscreen Nanoencapsulation Processes”. **Macromolecular Symposia**. v. 368, p. 60-69, 2016.

PAIVA, T. F.; “Análise de processos de nanoencapsulamento de filtros solares”. Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2015.

PAIVA, T. F.; “Desenvolvimento de micropartículas poliméricas inteligentes para liberação modificada do praziquantel para o tratamento da esquistossomose”. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2019.

PANDEY, R. C.; “Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources”. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, p. 333-346, 1998.

PARK, K.; “Controlled drug delivery systems: Past forward and future back.” **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3-8, 2014.

PARSONS, C.M.; BAKER, D.H.; “The concept and use of ideal proteins in the feedings of non-ruminants”. Simpósio Internacional de Produção de Não-ruminantes, Maringá, PR. Anais. 1994.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; *et al.*; **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed., cap 2, Belmont, USA, Brooks/Cole Cengage Learning, 2009.

PEIXOTO, A.C.B.; “Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação sítio-dirigida”. Dissertação de M. Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2013.

PETRESKA, G. S.; AUSCHRA, C.; PAULIS, M.; “Confinement driven crystallization of ABA crystalline-soft-crystalline block copolymers synthesized via RAFT mediated Miniemulsion polymerization.” **Polymer**, v. 158, p. 327-337, 2018.

PICHOT, C.; "Surface-functionalized latexes for biotechnological applications". **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 213-221, 2004.

PINTO, M. C. C.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C.; "Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*". **Molecules**, v. 19, p. 12509-12530, 2014.

QI, G.; JONES, C.W.; SCHORK, F.J.; "RAFT Inverse Miniemulsion Polymerization of Acrylamide". **Macromolecular Rapid Communication**, v. 28, p. 1010, 2007.

QIU, J.; CHARLEUX, B.; MATYJASZEWSKI, K.; "Controlled/living radical polymerization in aqueous media: homogeneous and heterogeneous systems". **Progress in Polymer Sciences**, v. 26, p. 2083, 2001.

QUAN, P.; XIA, D.; PIAO, H.; *et al.*; "Nitrendipine nanocrystals: Its preparation, characterization, and in vitro - in vivo evaluation". **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 1136-1143, 2011.

QUINN, J.F.; DAVIS, T.P.; BARNER, L.; *et al.*; "The application of ionizing radiation in reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization: Renaissance of a key synthetic and kinetic tool". **Polymer**, v. 48, p. 6467, 2007.

RAHMAN, A.; KORZEKWA, K. R.; GROGAN, J.; *et al.*; "Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxy taxol by human cytochrome P450 2C8". **Cancer Research**, v. 54, p. 5543-5546, 1994.

RAJAEI, A.; FARZI, G.; "Encapsulation of paclitaxel in ultra-fine nanoparticles of acrylic/styrene terpolymer for controlled release". **Colloid and Polymer Science**, v. 294, p. 95-105, 2016.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E.; "Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters". **Progress in Polymer Science**, v.36, p. 887-913, 2011.

RAPOPORT, N.; “Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery”. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 962, 2007.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; *et al.*; “Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs”. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1790, 2006.

RODDA, A. E.; MEAGHER, L.; NISBET, D.R.; *et al.*; “Specific control of cell– material interactions: Targeting cell receptors using ligand-functionalized polymer substrates.” **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1312-1347, 2014.

ROWINSKY, E. K.; EISENHAUER, E. A.; CHAUDHRY, V.; *et al.*; “Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol).” **Seminars on oncology**, v. 20, p. 1-15, 1993.

SANTOS, D. P. dos; “Produção de partículas de poli(acetato de vinila (PVAc) e poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PVAc-coPMMA) para imobilização de L-asparaginase, BSA e lisozima”. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2014.

SAVE, M.; GUILLANEUF, Y.; GILBERT, R. G.; “Controlled radical polymerization in aqueous dispersed media”. **Australian Journal of Chemistry**, v. 59, p. 693-711, 2006.

SAWALHA, H., SCHROEN, K., BOOM, R., “Biodegradable polymeric microcapsules: Preparation and properties”. **Chemical Engineering Journal**, v. 169 (1-3), p. 1-10, 2011.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; *et al.*; “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos”. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHORK, F.J.; LUO, Y.W.; SMULDERS, W.; *et al.*; “Miniemulsion Polymerization”. **Advances in Polymer Science**, v. 175, p. 129, 2005.

SEYMOUR, L.W.; DUNCAN, R.; STROHALM, J.; *et al.*; "Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamine copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats". **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 21, p. 1341-1358, 1987.

SEYMOUR, L.W.; MIYAMOTO, Y.; MAEDA, H.; *et al.*; "Influence of Molecular Weight on Passive Tumour Accumulation of a Soluble Macromolecular Drug Carrier". **European Journal of Cancer**, v.31, p. 766-770, 1995.

SHASTRI, V. P.; "Non-Degradable Biocompatible Polymers in Medicine: Past, Present and Future". **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, p. 331-337, 2003.

SHARMA, S.; VERMA, A.; TEJA, B. V.; *et al.*; "Development of Stabilized Paclitaxel nanocrystal: *In-vitro* and *in-vivo* efficacy studies". **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, p. 51-60, 2014.

SILVESTRI, D.; GAGLIARDI, M.; BARBANI, N.; *et al.*; "Synthesis and characterization of copolymers of methylmethacrylate and a-hydroxyethyl methacrylate for the aqueous solubilization of Paclitaxel." **Drug Delivery**, v. 16, p. 116-124, 2009.

SINGH, R., LILLARD, J. "Nanoparticle-based targeted drug delivery". **Experimental and molecular pathology**, v. 86 (3), p. 245-223, 2009.

SIVAKUMAR, M.; RAO, K. P.; "*In vitro* release of ibuprofen and gentamicin from PMMA functional microspheres". **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 13, n. 2, p. 111-126, 2002.

SOLOMON, D. H.; "Genesis of the CSIRO Polymer Group and the Discovery and Significance of Nitroxide-Mediated Living Radical Polymerization". **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 5748, 2005.

SONAJE, K.; ITALIA, J. L.; SHARMA, G.; *et al.*; "Development of Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Ellagic Acid and Evaluation of Their Antioxidant Efficacy Against Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity in Rats". **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p. 899-908.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; *et al.*; "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices". **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUNDERYA, N., ZHANG, Y. "Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications". **Recent Patents on Biomedical Engineering**, v. 1, p 34-42, 2008.

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, 2012.

SPARREBOOM, A.; VAN TELLINGEN, O.; NOOIJEN, W. J.; *et al.*; "Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL". **Cancer Research**, v. 56, p. 2112-2115, 1996.

SPENCER, C. M.; FAULDS, D.; "Paclitaxel: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential in the Treatment of Cancer". **Drugs**, v. 48, p. 794-847, 1994.

STANKEVICH, K. S.; DANILENKO, N. V.; GADIROV, R. M.; *et al.*; "A new approach for the immobilization of poly(acrylic) acid as a chemically reactive cross-linker on the surface of poly(lactic) acid-based biomaterials". **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 862-869, 2017.

STENZEL, M. H.; "RAFT polymerization an avenue to functional polymeric micelles for drug delivery." **Chemical communications**, v. 30, p. 3486-3503, 2008.

STEVENS; D. M.; GILMORE, K. A.; HARTH, E.; “An assessment of nanosponges for intravenous and oral drug delivery of BCS class IV drugs: Drug delivery kinetics and solubilization”. **Polymer Chemistry**, v. 5, p. 3551, 2014.

SUAVE, J.; DALL’AGNOL, E.; PEZZIN, A.; *et al.*; “Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas”. **Revista Saúde e Ambiente – Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUN, Y.; SU, J.; LIU, G.; *et al.*; “Advances of blood cell-based drug delivery systems”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 115-128, 2017.

SVENSON, S.; PRUD’HOMME, R. K.; **Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Imaging, targeting and delivery**, Springer, 1 ed., New York, USA.

THERMO SCIENTIFIC, Ellman’s Reagent. Documento 22582. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011216_Ellmans_Reag_UG.pdf>. Acesso em: 18 de abril de 2017.

THICKETT, S.C.; GILBERT, R.G.; “Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms”. **Polymer**, v. 48, p. 6965, 2007.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; *et al.*; “Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application”. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 237-280, 2012.

VAN TELLINGEN, O.; HUIZING, M. T.; PANDAY, V. R.; *et al.*; “Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients”. **British Journal of Cancer**, v. 81, p. 330-335, 1999.

VIGO, M. S.; MALEC, L. S.; GOMEZ, R. G.; *et al.*; "Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy products". **Food Chemistry - Analytical Methods Section**, v. 44, p. 363-365, 1992.

VOSLOO, J.J.; WET-ROSS, D.; TONGE, M.P.; *et al.*; "Controlled free radical polymerization in water-borne dispersion using reversible addition-fragmentation chain transfer". **Macromolecules**, v. 35, p. 4894-4902, 2002.

WANG, L.; CAI, M.; YUAN, L.; *et al.*; "Polymer hydrophobicity regulates paclitaxel distribution in microspheres, release profile and cytotoxicity in vitro". **Powder Technology**, v. 275, p. 77-84, 2015.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. W.; *et al.*; "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*". **Journal of American Chemical Society**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WAY, D. V.; BRAIDO, R. S.; REIS, S. A.; *et al.*; "Miniemulsion RAFT Copolymerization of MMA with Acrylic Acid and Methacrylic Acid and Bioconjugation with BSA". **Nanomaterials**, v. 9, p. 828-843, 2019.

WU, C.; LIU, Y.; XU, X. Y.; "Pure paclitaxel nanoparticles: preparation, characterization, and antitumor affect for human liver cancer SMMC-7721 cells". **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 6189-6198, 2018.

YANG, L.; LUO, Y.; LIU, X.; *et al.*; "RAFT Miniemulsion polymerization of methylmethacrylate". **Polymer**, v. 50, p. 4334-4342, 2009.

YANG, S.; CHENG, M.; LEE, N.; *et al.*; "Paclitaxel-related nail toxicity." **Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 58, p. 709-711, 2019.

YUKSEL, N.; BAYKARA, M.; SHIRINZADE, H.; *et al.*; "Investigation of triacetin effect on indomethacin release from poly(methyl methacrylate) microspheres: Evaluation of interactions using FT-IR and NMR spectroscopies". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 102-109, 2011.

ZETTERLUND, P.B.; ALAM, M.N.; MINAMI, H.; *et al.*; "Nitroxide-Mediated Controlled/Living Free Radical Copolymerization of Styrene and Divinylbenzene in Aqueous Miniemulsion". **Macromolecular Rapid Communication**, v. 26, p. 955, 2005.

ZETTERLUND, P.B., KAGAWA, Y., OKUBO, M. "Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems". **Chemical Reviews**, v.108, p.3747–3794, 2008.

ZHANG, Z.; MEI, L.; FENG, S. S.; "Paclitaxel drug delivery systems". **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, p. 325-340, 2013.

ZHOU, J.; YAO, H.; MA, J.; "Recent advances in RAFT-mediated surfactant-free emulsion polymerization". **Polymer Chemistry**, v. 9, p. 2532-2561, 2018.

ZHOU, X.; NI, P.; YU, Z.; "Comparison of RAFT polymerization of methyl methacrylate in conventional emulsion and Miniemulsion systems". **Polymer**, v. 48, p. 6262-6271, 2007.

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.

ZIMMERMANN, J.L.; NICOLAUS, T.; NEUERT, G.; *et al.*; "Thiol-based, site-specific and covalente immobilization of biomolecules for single-molecule experiments". **Nature Protocols**, v. 5, p. 975-985, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A

Cálculo da massa de surfactante livre para formação de micelas

$$M'_s = M_s^0 - M_s^{ad}$$

$$M_s^{ad} = \frac{A_{total}}{a_s} = \frac{6 \cdot M}{\rho \cdot d \cdot a_s}$$

$$a_s^* = \frac{6 \cdot \varphi}{\chi_{3,2} \cdot \rho_{MMA} \cdot C_{SDS} \cdot \kappa}$$

$$a_s^* = \frac{6 \cdot 0,1}{195,29 \cdot 0,94 \cdot 0,0047 \cdot 0,8} = 1,39 \cdot 10^3 \frac{m^2}{g}$$

$$M_s^{ad} = \frac{6 \cdot 9,55}{0,94 \cdot 10^6 \cdot 195,29 \cdot 10^{-9} \cdot 1,39 \cdot 10^3} = 0,3652 \text{ g de SDS}$$

$$M'_s = 0,478 - 0,3652 = 0,1126 \text{ g}$$

$$C'_s = \frac{M'_s}{Vol_{\acute{a}gua}} = \frac{0,1126}{90} = 1,25 \cdot 10^{-3} \frac{g}{mL} < CMC_{SDS} = 2,36 \cdot 10^{-3} \frac{g}{mL}$$

Em que M'_s é a aassa de surfactante disponível para formar micela; M_s^0 é a massa de surfactante alimentada = 0,478 g; M_s^{ads} é a massa de surfactante adsorvido na interface; A_{total} é a área total das gotículas de monômero; M é a massa de monômero alimentada = 9,55 g; ρ é o volume específico do monômero = 0,94 g/cm³; d é o diâmetro médio de

gota = 195,29 nm; a_s é a área ocupada pelo surfactante/ eficiência de cobertura [$\text{m}^2/\text{g}_{\text{surf}}$]; φ é a fração da fase orgânica = 0,10; $X_{3,2}$ é o diâmetro médio de Sauter = 195,29 nm; C_{sds} é a concentração de SDS em massa do total = 0,0047; k é o fator de correlação que leva em conta a concentração dissolvida no meio contínuo = 0,8*; $\text{Vol}_{\text{H}_2\text{O}}$ é o volume de água = 90 mL.

* HECHT, L. L. *et al.* (2011).

Apêndice B

Distribuições de tamanhos de partícula

Apresentam-se a seguir as distribuições de tamanho de partícula obtidas para os materiais produzidos pelas reações descritas na tese.

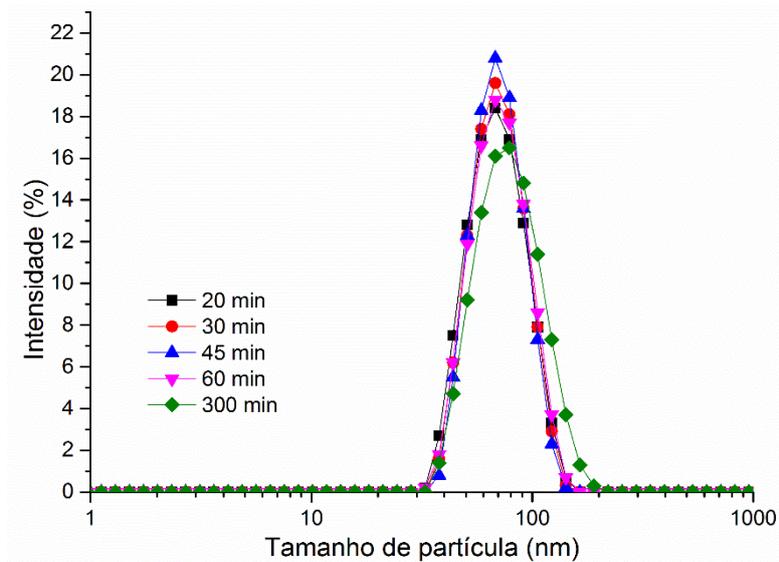


Figura B.1 - Distribuições de tamanhos de partícula da reação R7, polimerização radicalar convencional – P(MMA-co-AA) + 0,75% PTX

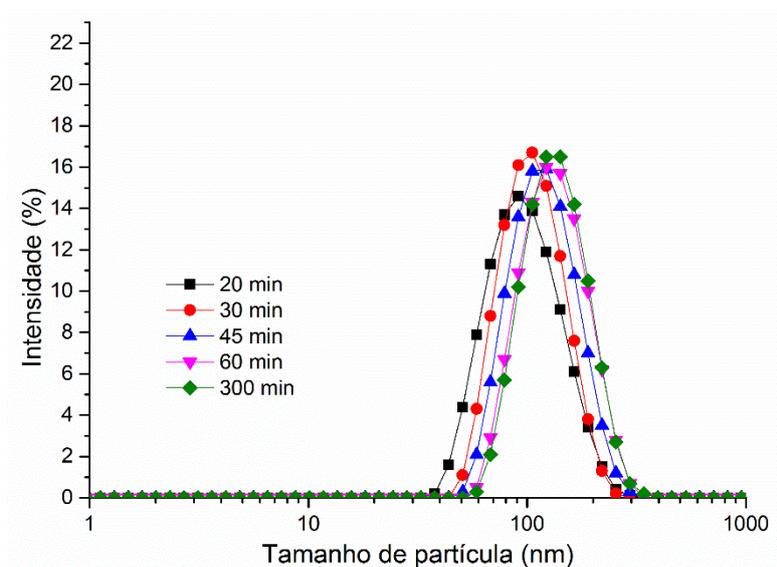


Figura B.2 - Distribuições de tamanhos de partícula da reação R8, polimerização radicalar RAFT – P(MMA-co-AA) + RAFT + 0,75% PTX

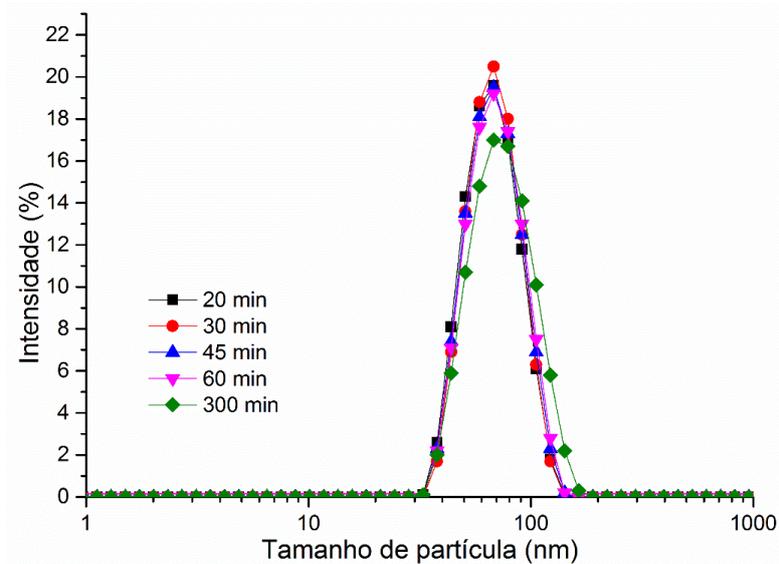


Figura B.3 - Distribuições de tamanhos de partícula da reação R9, polimerização radicalar convencional – P(MMA-co-AA) + 0,5% PTX

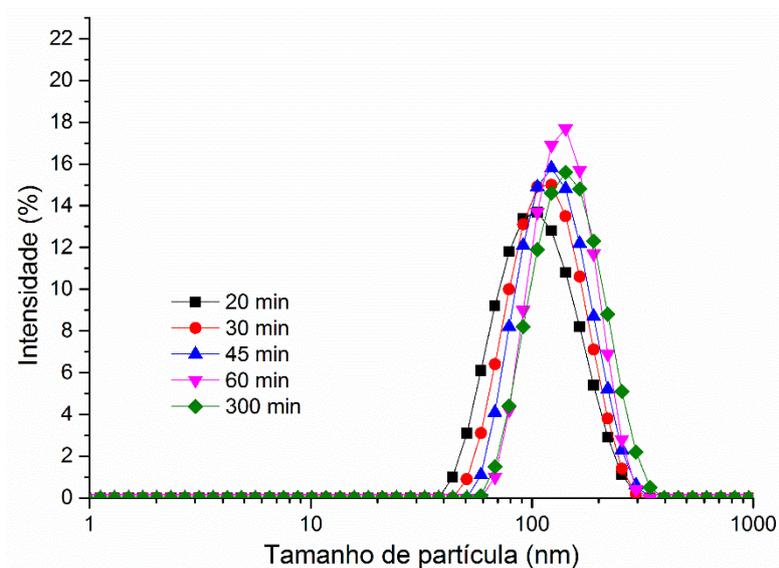


Figura B.4 - Distribuições de tamanhos de partícula da reação R10, polimerização radicalar RAFT – P(MMA-co-AA) + RAFT + 0,5% PTX

Apêndice C

Cálculo da massa molar numérica média teórica

$$M_n = \left(\frac{[M]_0}{[RAFT]_0} \times Mw_{monômero} \times \alpha \right) + Mw_{RAFT}$$

em que M_n é a massa molar numérica média teórica; $[M]_0$ é a concentração inicial de monômero = 1,89 mol/L; $[RAFT]_0$ é a concentração inicial de agente RAFT = 0,01 mol/L; $Mw_{monômero}$ é a massa molar do monômero = 100,121 g/mol; α é a conversão = 1,0; Mw_{RAFT} é a massa molar do agente RAFT = 221,34 g/mol.

$$M_n = \left(\frac{1,89}{0,01} \times 100,121 \times 1,0 \right) + 221,34 = 19986,8 \frac{g}{mol}$$

Apêndice D

Curvas de distribuição de massas molares

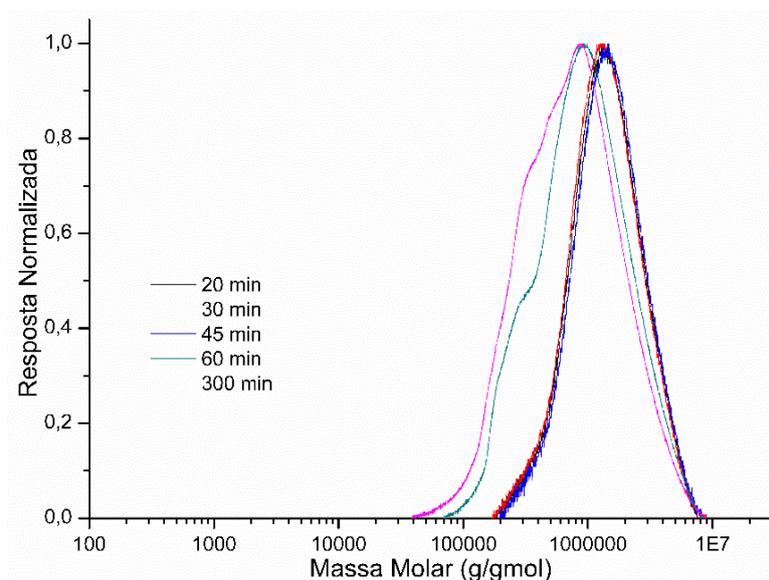


Figura D.1 - Curvas de distribuição de massas molares para a reação R7 - P(MMA-co-AA) + 0,75% PTX

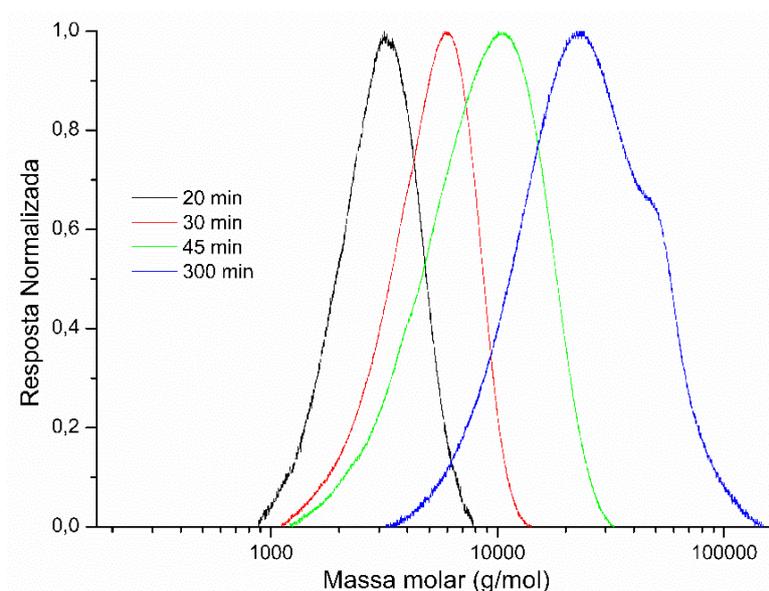


Figura D.2 - Curvas de distribuição de massas molares para a reação R9 - P(MMA-co-AA) + RAFT + 0,75% PTX

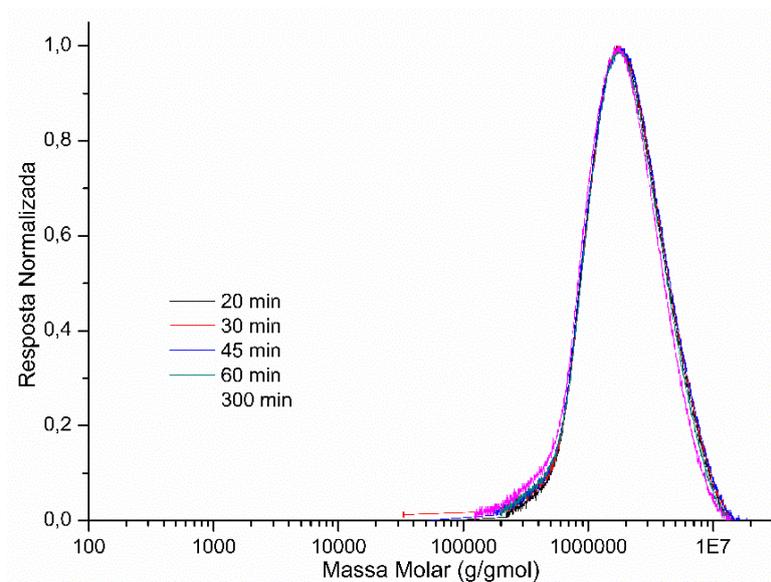


Figura D.3 - Curvas de distribuição de massas molares para a reação R9 - P(MMA-co-AA) + 0,5% PTX

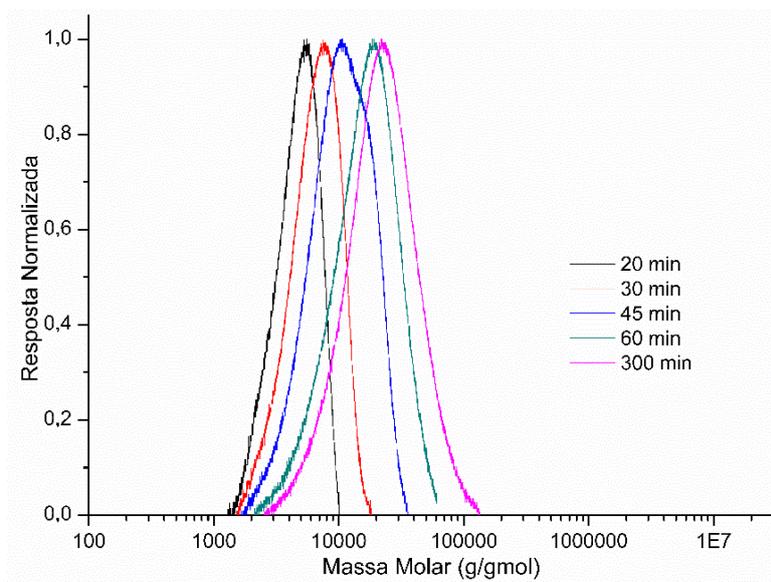


Figura D.4 - Curvas de distribuição de massas molares para a reação R10 - P(MMA-co-AA) + RAFT + 0,5% PTX

Apêndice E

Redução do grupo tiocarbonila do agente RAFT em tiol

Tabela E. 1 - Tabela de dados para obtenção da concentração de sulfidrilas livres

Concentração da solução (mM)	Absorbância medida	c (mol/L)	SH (mol)	Concentração de SH (mol/L)
1.5	1.027	0.000145159	4.06445E-07	1,63.10 ⁻⁰³
1.25	0.877	0.000123958	3.47081E-07	1,39.10 ⁻⁰³
1	0.686	9.69611E-05	2.71491E-07	1,09.10 ⁻⁰³
0.75	0.515	7.27915E-05	2.03816E-07	8,15.10 ⁻⁰⁴
0.5	0.353	4.9894E-05	1.39703E-07	5,59.10 ⁻⁰⁴
0.25	0.18	2.54417E-05	7.12367E-08	2,85.10 ⁻⁰⁴
0	0	0	0	0,00.10 ⁺⁰⁰

$$E = \frac{A}{b \cdot c} \quad (12)$$

em que E é o coeficiente de extinção molar do TBN no tampão de sistema = 14150 M⁻¹ cm⁻¹; b é a largura da cubeta = 0,5 cm; A é a absorbância medida; c é a concentração, em mol/L, da solução contida na cubeta.

Se a concentração da solução é c, então 2,8 mL de solução (2,5 mL de tampão de Reação + 0,25 mL de solução com cisteína + 0,05 mL de Solução de Reagente Ellman) contém:

$$SH \text{ (mol)} = c * \frac{2,8}{1000} \quad (13)$$

Esta quantidade de SH (mol) está contida em 0,25 mL de solução de cisteína, logo:

$$\text{Concentração de SH (mol/L)} = SH * \frac{0,25}{1000} \quad (14)$$

Apêndice F

Dosagem de biomoléculas

- Método de Bradford

Para o preparo do reagente de BRADFORD, dissolveram-se 0,5 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 mantido 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 filtrado.

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 diluição, de forma a obter uma variação de concentração de 0,01 a 0,1 g/L, como mostrado na Tabela F.1. A leitura das concentrações foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 595 nm.

Tabela F.1 - Sequência de diluição para montagem da curva de calibração

Tubo	Conc. (g/L)	Vol. padrão (mL)	Vol. H₂O (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 a 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 de diluições, de acordo com a Tabela F.2.

Tabela F.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.