

Luana Becker Peres

**SÍNTESE DE POLÍMEROS A PARTIR DE AMINOÁCIDOS E O  
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA  
ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Química  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Engenharia Química.  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Sayer  
Coorientador: Prof. Dr. Pedro H. H. de  
Araújo

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Peres, Luana Becker

Síntese de Polímeros a Partir de Aminoácidos e o Desenvolvimento de  
Sistemas Nanoparticulados para Encapsulação de Fármacos / Luana Becker Peres  
; orientadora, Claudia Sayer ; coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo -  
Florianópolis, SC, 2016.

157 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro  
Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas. 3. Hidrogéis. 4. Polímeros  
derivados de aminoácidos. 5. Polimerização em miniemulsão inversa. I. Sayer,  
Claudia. II. De Araujo, Pedro Henrique Hermes. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Luana Becker Peres

**SÍNTESE DE POLÍMEROS A PARTIR DE AMINOÁCIDOS E O  
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA  
ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Sayer  
Orientadora

---

Prof. Dr. Pedro H. H. de Araújo  
Coorientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cintia Soares  
Coordenadora do PósENQ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Immich  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane da Costa Bresolin  
UFSC

---

Prof. Dr. José Carlos Pinto  
UFRJ

---

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves  
UTFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza  
UFSC

Florianópolis, 21 de março de 2016.



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
de vida e coração e a Rafael.



## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Pedro e Rute, e à Cacai, por toda dedicação e amor incondicional. Ao Léo e Ana. À minha irmã, Laize, por todos os chicletes e pela dedicação e ótimo trabalho desenvolvido como aluna de Iniciação Científica ao longo desses quatro anos, que tanto me ajudou. Às Nenas.

Ao Rafa, pelo amor e carinho, porque nem todos os dias foram de sol (e pela paciência, claro).

Aos meus orientadores, Dr.<sup>a</sup> Claudia Sayer e Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo, pelas ideias e colaboração tão necessárias no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e ensinamento. Ao Dr. Rafael Muñoz-Espí, pela coorientação no velho continente, e à Dr.<sup>a</sup> Katharina Landfester, pela oportunidade. A todos eles que me permitiram o doutorado sanduíche e me mostraram que a pesquisa é um mar revolto que precisa ser velejado. Por abrirem as portas do mundo. Por isso, hoje sou uma pessoa melhor e maior.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Processos (LCP), pela amizade e apoio em todos os dias de trabalho desses últimos 6 anos, em especial aos integrantes do grupo de miniemulsão. À Claudinha. Ao Raul Silva dos Anjos, pelo trabalho desenvolvido como aluno de Iniciação Científica.

Aos colegas do Max Planck Institute for Polymer Research, por me ensinarem tanto. À Beatriz Ma, Lillian Uchoa, Kartheek Katta, Alice Antonello, Diego Estupiñán e Cesare Benedetti. Porque o MPIP é mais divertido com vocês. À Laura Preiss, pela amizade, por me mostrar o mundo dos aminoácidos e do RMN.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial ao LCP, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e ao Max Planck Institute for Polymer Research, por todos os recursos disponibilizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no Brasil e exterior (bolsista CAPES – Proc. nº 99999.014218/2013-05).

Obrigada!



“Do not take life too seriously. You will never get out of it alive.”

(Elbert Hubbard)



## RESUMO

Nanocarreadores poliméricos e lipídicos apresentam potencial aplicabilidade como sistemas de administração de fármacos com liberação lenta e progressiva. A nanoencapsulação de fármacos favorece o aumento da biodisponibilidade e da eficácia do composto ativo, bem como a redução dos efeitos colaterais adversos. Dada à necessidade por uma nova geração de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, os quais apresentam características interessantes para a aplicação biomédica, o presente trabalho visou o desenvolvimento de novos materiais poliméricos derivados de aminoácidos, com potencial biodegradabilidade e biocompatibilidade, para aplicação como sistemas nanoparticulados carreadores de fármacos para liberação sustentada. Assim, a síntese de polímeros derivados de *L*-lisina e *L*-ácido glutâmico via reações de polimerização por ALTMET e por radicais livres, respectivamente, é aqui apresentada. As reações de copolimerização por ALTMET dos monômeros *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-fosfodiéster dieno foram conduzidas utilizando os catalisadores Grubbs e Hoveyda-Grubbs segunda geração e Umicore M2. As condições das reações foram eficientemente adaptadas para minimizar a desativação dos catalisadores, e copolímeros com massa molar variando entre 2600 e 18000 g/mol foram obtidos, sendo o grau de alternância-AB dos copolímeros determinado em aproximadamente 90%. De caráter hidrofóbico, este polímero é indicado para a encapsulação de compostos hidrofóbicos, dada à sua baixa afinidade pela água. Preparadas através da técnica de miniemulsão/evaporação do solvente, as nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster), com diâmetro médio entre 50 e 80 nm, apresentaram eficiência de encapsulação de rifampicina, um fármaco hidrofóbico antituberculose, superior a 94% e teores de fármaco de até 480 mg<sub>rif</sub>/g<sub>pol</sub>. As reações de polimerização por radicais livres do monômero *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico, por outro lado, resultaram na formação de hidrogéis fisicamente reticulados (P(*L*-AGA)). Hidrogéis quimicamente reticulados (P(*L*-AGA-*co*-BIS)) foram também obtidos a partir da copolimerização dos monômeros *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico e *N,N'*-metilenobis (acrilamida). Ambos os polímeros mostraram níveis de intumescimento sensíveis a variações no pH, sendo o P(*L*-AGA) e P(*L*-AGA-*co*-BIS) capazes de absorver até 350 e 15 vezes a sua massa em água, respectivamente. De natureza hidrofílica, os nanogéis biocompatíveis de P(*L*-AGA) e P(*L*-AGA-*co*-BIS) são indicados para a encapsulação de compostos hidrofílicos. Sintetizados via polimerização em miniemulsão inversa, os nanogéis, com diâmetro

variando entre 270 e 370 nm, apresentaram grande capacidade de encapsulação de cloridrato de doxorubicina, com eficiência de encapsulação superior a 80% e teor de fármaco superior a  $41 \text{ mg}_{\text{doxo}}/\text{g}_{\text{pol}}$ . Como segundo objetivo, este trabalho ainda buscou desenvolver novas estratégias de preparação de nanopartículas para encapsulação simultânea de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Para tanto, uma adaptação da técnica de fusão/dupla emulsão, que dispensa o uso de solventes orgânicos, foi proposta almejando-se a produção de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Os resultados obtidos mostram que é possível obter dispersões estáveis de nanopartículas com diâmetro médio entre 270 e 550 nm, sendo, entre os parâmetros avaliados, o tipo e concentração de surfactante os fatores que mais exerceram efeito sobre o tamanho final de partícula. A técnica proposta mostrou-se bastante eficaz para encapsulação de ambos compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, tendo sido obtida eficiência de encapsulação superior a 60% e 95% para os compostos hidrófilos e hidrófobos, respectivamente. De maneira geral, as nanopartículas desenvolvidas neste trabalho apresentam um elevado potencial de aplicação como sistemas carreadores de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos nas áreas farmacêutica, cosmética e de alimentos.

**Palavras-chave:** Nanopartículas. Hidrogéis. Polímeros derivados de aminoácidos. ALTMET. ADMET. Polimerização em miniemulsão inversa. Liberação sustentada de fármacos.

## ABSTRACT

Polymer and lipid nanocarriers show potential applicability as controlled drug delivery systems with a slow and sustained release. Drug nanoencapsulation promotes improvement of drug bioavailability and efficacy, as well as reduction of adverse side effects. Giving the necessity of a new generation of biodegradable and biocompatible polymers, which have interesting characteristics for biomedical application, the synthesis of potentially biodegradable and biocompatible amino-acid-based polymers for application as drug delivery systems was the main goal of this work. Thus, the synthesis of *L*-lysine and *L*-glutamic acid-based polymers via ATRP and free-radical polymerization reactions, respectively, is herein presented. The ATRP copolymerization of *N,N'*-bis(acryloyl)-ethyl ester *L*-lysine and phenyl phosphate diene was carried out using Grubbs and Hoveyda Grubbs 2<sup>nd</sup> generation and Umicore M2 catalysts. The reaction was tailored to minimize deactivation of ruthenium catalysts, and alternated *L*-lysine-phosphoester copolymers with molar masses varying from 2600 to 18000 g/mol were obtained, showing an AB-alternation degree of approximately 90%. Due to its hydrophobicity, this polymer is suitable for encapsulation of hydrophobic compounds with low water affinity. Poly(*L*-lysine-*co*-phosphate) nanoparticles with controlled particle size in the range of 50-80 nm were prepared by miniemulsion/solvent evaporation technique. The nanoparticles were efficiently loaded with rifampicin (up to 50 wt%), a hydrophobic antituberculosis drug, with encapsulation efficiency higher than 94 % and loading of up to 480 mg<sub>rif</sub>/g<sub>pol</sub>, respectively. On the other hand, the free-radical polymerization of *N'*-(acryloyl)-*L*-glutamic acid lead to formation of physically crosslinked hydrogels (P(*L*-AGA)). Chemically crosslinked hydrogels (P(*L*-AGA-*co*-BIS)) were also synthesized by copolymerization of *N'*-(acryloyl)-*L*-glutamic acid and *N,N'*-methylenebisacrylamide monomers. Both polymers have shown swelling behaviors pH-dependent, and (P(*L*-AGA)) and P(*L*-AGA-*co*-BIS) were able to absorb up to 350 and 15 times their dry weight in water. Biocompatible nanogels in the size range of 270-370 nm were prepared by inverse miniemulsion polymerization technique and loaded with doxorubicin-HCl (hydrophilic chemotherapy drug) with encapsulation efficiency higher than 83% and incorporation loading of approximately 41 mg<sub>dox</sub>/g<sub>pol</sub>. This work also targeted the development of new strategies for nanoparticles synthesis aiming the encapsulation of both hydrophilic and hydrophobic drugs. Therefore, the preparation of solid lipid nanoparticles (SLN) by a modified organic solvent free double

emulsion/melt dispersion technique is herein proposed. Stable SLN dispersions with average size ranging from 270 to 550 nm were obtained, and, among the evaluated parameters, the type and concentration of surfactant have shown increased effect over the final particle size and dispersion stability. The proposed technique has been shown to be an effective method for loading both hydrophilic and hydrophobic compounds, with encapsulation efficiency higher than 60 % and 95 % for hydrophilic and hydrophobic compounds, respectively. The nanoparticles developed in this work present a high potential for food, cosmetic and pharmaceutical fields application as delivery systems of biocompatible compounds of both hydrophilic and hydrophobic nature.

**Keywords:** Nanoparticles. Hydrogel. Amino-acid-based polymers. ALTMET. ADMET. Inverse miniemulsion polymerization. Drug delivery systems.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: administração convencional vs. sustentada.....	32
<b>Figura 2</b> - Representação do método de miniemulsificação/evaporação do solvente.....	36
<b>Figura 3</b> - Representação do método de dupla miniemulsificação/evaporação do solvente.....	38
<b>Figura 4</b> - Representação da técnica de Polimerização em Miniemulsão.....	41
<b>Figura 5</b> - Representação da técnica de Polimerização em Miniemulsão Inversa.....	43
<b>Figura 6</b> - Representação da técnica de Polimerização Interfacial em Miniemulsão Inversa.....	45
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo da porosidade da rede polimérica em seu estado intumescido e desintumescido.....	48
<b>Figura 8</b> - Princípio da reação de metátese de olefinas.....	50
<b>Figura 9</b> - Principais reações de metátese de olefinas.....	51
<b>Figura 10</b> - Ciclo catalítico para reações de metátese do tipo ADMET com complexo metal-carbeno.....	52
<b>Figura 11</b> - Mecanismo de polimerização por ALTMET.....	53
<b>Figura 12</b> - Esquema da reação de polimerização de monômero derivado de aminoácidos com cadeia carbônica estendida.....	58
<b>Figura 13</b> - Catalisadores utilizados nas reações de polimerização por ALTMET.....	59
Figura 14 - Rota de síntese do <i>N,N'</i> -bisacrilamida-etil-éster- <i>L</i> -lisina....	60
<b>Figura 15</b> - Esquema da reação de polimerização do <i>N,N'</i> -bisacrilamida-etil-éster- <i>L</i> -lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ADMET.....	61
<b>Figura 16</b> - Rota de síntese de poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina- <i>co</i> -fenilfosfodiéster) por ALTMET.....	62
<b>Figura 17</b> - Representação da formação de nanocápsulas por reações ALTMET via polimerização interfacial em miniemulsão inversa.....	63
<b>Figura 18</b> - Estrutura molecular da rifampicina e SDS.....	65
<b>Figura 19</b> - Espectro <sup>1</sup> H-RMN (300 MHz) do <i>N,N'</i> -bisacrilamida-etil-éster- <i>L</i> -lisina em Acetonitrila- <i>d</i> <sub>3</sub> .....	68
<b>Figura 20</b> - Espectro <sup>1</sup> H-RMN (300 MHz) do homopolímero poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	69

<b>Figura 21</b> - Espectro $^1\text{H}$ -RMN (850 MHz) do fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato em THF- $d_8$ .	70
<b>Figura 22</b> - Espectro $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do homopolímero poli(fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .	71
<b>Figura 23</b> - Espectro $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz) do copopolímero poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .	73
<b>Figura 24</b> - Espectro COSY-RMN (700 MHz) do copopolímero poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .	74
<b>Figura 25</b> - Espectro $^1\text{H}$ -RMN de ambos os monômeros (850 MHz) e do copopolímero poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) (C3, 700 MHz) em THF- $d_8$ .	75
<b>Figura 26</b> - Espectro DOSY-RMN (700 MHz) do copopolímero poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .	76
<b>Figura 27</b> - Curvas de (a) TGA e (b) DSC do copolímero poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) (C4, Tabela 3).	77
<b>Figura 28</b> - Estrutura molecular do cloridrato de doxorrubicina e dos surfactantes utilizados.	85
<b>Figura 29</b> - Rota de síntese do <i>N</i> -acrilamida- <i>L</i> -ácido glutâmico.	85
<b>Figura 30</b> - Rota de síntese dos polímeros P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA-co-BIS).	86
<b>Figura 31</b> - Espectro $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do <i>N</i> -acrilamida- <i>L</i> -ácido glutâmico em DMSO- $d_6$ .	94
<b>Figura 32</b> - Grau de intumescimento ( $g_{\text{H}_2\text{O}}/g_{\text{P}}$ ) e teor de gel (%) do P( <i>L</i> -AGA) preparado com diferentes quantidades de (a) monômero e (b) iniciador; (c) P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) preparado com diferentes quantidades de BIS (barras de erro representam desvio padrão, $n = 3$ ).	97
<b>Figura 33</b> - Fotografia dos hidrogéis de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) no teste de intumescimento em água ao longo de 6 h.	99
<b>Figura 34</b> - Efeito do pH sobre o grau de intumescimento ( $g_{\text{H}_2\text{O}}/g_{\text{Poi}}$ ) de hidrogéis de (a) P( <i>L</i> -AGA) (B9, Tabela 6) e (b) P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) (B11, Tabela 6) (barra de erros representam desvio padrão, $n = 3$ ).	100
<b>Figura 35</b> : Curvas de (a) TGA e (b) DSC dos hidrogéis de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) (B9 e B11, Tabela 6).	102
<b>Figura 36</b> - Efeito da concentração de monômero sobre $D_p$ das nanopartículas de P( <i>L</i> -AGA) em ciclohexano (barra de erros representa a dispersão das partículas).	103
<b>Figura 37</b> : Efeito do tipo de iniciador (KPS e AIBN) e concentração de reticulante (BIS) sobre $D_p$ das nanopartículas de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -	

AGA- <i>co</i> -BIS) em ciclohexano (barra de erros representa a dispersão das partículas). .....	103
<b>Figura 38</b> - Imagens de MEV dos nanogéis de (a) P( <i>L</i> -AGA) e (b) P( <i>L</i> -AGA- <i>co</i> -BIS) (M2 e M6, Tabela 6) (placas de sílica preparados a partir de amostras dispersas em ciclohexano).....	105
<b>Figura 39</b> - Efeito do tipo de iniciador (KPS e AIBN) e concentração de reticulante (BIS) sobre Dp das nanopartículas de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA- <i>co</i> -BIS) em água: (a) e (b) raio hidrodinâmico das partículas determinado por DLS multi-ângulo; (c) tamanho de partícula a 0° determinado por extrapolação das curvas em (b).....	107
<b>Figura 40</b> - Estudo da citotoxicidade dos nanogéis de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA- <i>co</i> -BIS) (M2 e M6, Tabela 7) em cultura de células HeLa (barra de erros representam desvio padrão, n = 3). .....	109
<b>Figura 41</b> - Estudo da citotoxicidade dos nanogéis de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA- <i>co</i> -BIS) (M2 e M6, Tabela 7) em cultura de células L929 (barra de erros representam desvio padrão, n = 3). .....	109
<b>Figura 42</b> - Ensaio de hemólise dos nanogéis de (a) P( <i>L</i> -AGA) (M2, Tabela 7) e (b) P( <i>L</i> -AGA- <i>co</i> -BIS) (M6, Tabela 7). Taxa relativa de hemólise após a incubação das nanopartículas por 24 h usando diferentes concentrações de nanopartículas. (barra de erros representam desvio padrão, n = 3). .....	111
<b>Figura 43</b> - Estrutura molecular dos surfactantes utilizados. ....	115
<b>Figura 44</b> - Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico. ....	116
<b>Figura 45</b> - Efeito do tempo de sonicação (1ª emulsão:2ª emulsão) sobre Dp e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média ± DP, n≥3). .....	121
<b>Figura 46</b> - Estabilidade das dispersões de nanopartículas sólidas de ácido esteárico estocadas a 4°C (Média ± DP, n ≥ 2). *Pelo menos uma das dispersões apresentou formação de precipitado.....	124
<b>Figura 47</b> - Imagens de MET das nanopartículas de ácido esteárico preparadas com o par Lectina/Tween na concentração de 1/10% (Amostra F6, Tabela 10). .....	126
<b>Figura 48</b> - Imagens de MET em sequência exemplificando a modificação das nanopartículas de ácido esteárico com o feixe de elétrons (80 kV). .....	127
<b>Figura 49</b> - Efeito do volume de água gelada sobre Dp e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média ± DP, n≥3).....	128
<b>Figura 50</b> - Efeito da concentração de ácido esteárico sobre Dp e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média ± DP, n≥3).....	129

<b>Figura 51</b> - Efeito da proporção Ácido Esteárico/Crodamol sobre o $D_p$ e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média $\pm$ DP, $n \geq 2$ )..	131
<b>Figura 52</b> - Curvas de DSC do ácido esteárico puro (AcEstco), nanopartículas de ácido esteárico (NP-AcEstco) e nanopartículas de ácido esteárico/crodamol (NP-AcEstco+crodamol, 85/15%).	132
<b>Figura 53</b> - Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de nanopartículas lipídicas preparadas com a incorporação simultânea do marcador hidrofílico (SR-101) e lipofílico (6-coumarin). Na ordem: microscopia com fluorescência filtro verde e com fluorescência filtro vermelho.	134
<b>Figura 54</b> - Efeito da degradação do marcador hidrofílico com o feixe de luz com o passar tempo.	135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Formulações das reações de copolimerização de <i>N,N'</i> -bisacrilamida-etil-éster- <i>L</i> -lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ALTMET em solução. ....	62
<b>Tabela 2</b> - Formulações das reações de copolimerização de <i>N,N'</i> -bisacrilamida-etil-éster- <i>L</i> -lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ALTMET em miniemulsão inversa. ....	64
<b>Tabela 3</b> - Efeito do tipo e concentração de catalisador, concentração de monômero e temperatura reacional sobre a massa molar do poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) obtido via polimerização por ALTMET em solução. ....	72
<b>Tabela 4</b> - Resultados obtidos nas reações de copolimerização de <i>N,N'</i> -bisacrilamida-etil-éster- <i>L</i> -lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ALTMET em miniemulsão inversa. ....	78
<b>Tabela 5</b> - Tamanho médio ( $D_p$ ), distribuição do tamanho (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) de nanopartículas de poli(bisacrilamida- <i>L</i> -lisina-co-fenil-fosfodiéster) obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (médias $\pm$ desvio padrão, $n = 2$ ) .....	80
<b>Tabela 6</b> - Formulações adotadas para síntese dos polímeros P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) via polimerização em solução a 80 °C. ....	87
<b>Tabela 7</b> - Formulações adotadas para a síntese de nanogéis de P( <i>L</i> -AGA) and P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) via polimerização em miniemulsão inversa. ....	88
<b>Tabela 8</b> - Massa molar média do poly( <i>L</i> -AGA) preparadas via polimerização em solução (amostras completamente solúveis em água).....	95
<b>Tabela 9</b> - Tamanho médio ( $D_p$ ), dispersão (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) dos nanogéis de P( <i>L</i> -AGA) e P( <i>L</i> -AGA-co-BIS) preparadas por polimerização em miniemulsão inversa (média $\pm$ desvio padrão, $n = 4$ ).....	108
<b>Tabela 10</b> - Formulações adotadas para preparação das nanopartículas via fusão/dupla emulsão.....	118
<b>Tabela 11</b> - Efeito do tipo e concentração de surfactante sobre $D_p$ , PDI e PZ das nanopartículas de ácido esteárico (Média $\pm$ DP, $n \geq 3$ )...	123
<b>Tabela 12:</b> Temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura onset de fusão ( $T_{onset}$ ), entalpia de fusão cristalina ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalização ( $\chi_c$ ) .....	132

<b>Tabela 13</b> - Eficiência de encapsulação dos corantes SR 101 e 6-Coumarin em nanopartículas lipídicas.....	136
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{H-RMN}$	–	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio;
ADMET	–	<i>Acyclic diene metathesis</i> ;
AIBN	–	Azobisisobutironitrila;
ALTMET	–	<i>Alternating diene metathesis</i> ;
BIS	–	Metilenobisacrilamida;
CME	–	Concentração mínima de eficiência;
CMT	–	Concentração mínima de toxicidade;
COSY	–	Espectroscopia RMN de correlação;
CTMA-Cl	–	Cloreto de cetiltrimetilamônio;
DCM	–	Diclorometano;
DLS	–	Espalhamento dinâmico de luz;
DMSO	–	Dimetilsulfóxido;
DOSY	–	Espectroscopia RMN ordenada por difusão;
DOXO	–	Cloridrato de doxorubicina;
$D_p$	–	Diâmetro médio de partícula;
DP	–	Desvio padrão;
DSC	–	Calorimetria diferencial de varredura;
EE	–	Eficiência de encapsulação;
G-2	–	Grubbs 2 <sup>a</sup> geração (catalisador);
GPC	–	Cromatografia de permeação em gel;
HG-2	–	Hoveyda-Grubbs 2 <sup>a</sup> geração (catalisador);
HLB	–	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i> (Balanço hidrofílico-lipofílico);
KPS	–	Persulfato de potássio;
<i>L-AGA</i>	–	<i>N</i> -acrilamida- <i>L</i> -ácido glutâmico;
LCST	–	<i>Lower critical solution temperature</i> ;
MET	–	Microscopia eletrônica de transmissão;
MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura;
NLS	–	Nanopartículas lipídicas sólidas;
NP	–	Nanopartículas;
OMS	–	Organização Mundial da Saúde;
<i>P(L-AGA)</i>	–	Poli(acrilamida- <i>L</i> -ácido glutâmico);
<i>P(L-AGA-co-BIS)</i>	–	Poli(acrilamida- <i>L</i> -ácido glutâmico- <i>co</i> -BIS);
PBA	–	Poli(adipato de butila);
PCL	–	Poli(caprolactona);
PDI	–	Distribuição de tamanho de partícula;

PEG	–	Poli(etilenoglicol);
PGPR	–	Poliglicerol poliricinoleato;
PHB	–	Poli(hidroxiбутirato);
PHEMA	–	Poli(2-hidroxietyl metacrilato);
PLA	–	Poli(ácido lático);
PLGA	–	Poli(ácido lático- <i>co</i> -glicólico);
PLLA	–	Poli(L-ácido lático);
PMMA	–	Poli(metacrilato de metila);
PNIPAAm	–	Poli( <i>N</i> -isopropilacrilamida);
PS	–	Poliestireno;
PVAc	–	Poli(acetato de vinila);
PZ	–	Potencial zeta;
RIF	–	Rifampicina;
ROMP	–	<i>Ring closing metathesis polymerization</i> ;
SDS	–	Lauril sulfato de sódio/Dodecil sulfato de sódio;
SR-101	–	Sulfurodamina 101;
T80	–	Tween 80;
TB	–	Tuberculose;
T <sub>g</sub>	–	Temperatura de transição vítrea;
TGA	–	Análise termogravimétrica;
THF	–	Tetrahidrofurano;
UM2	–	Umicore M2 (catalisador);

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>27</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS .....	29
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO .....	30
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>31</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>31</b>
2.1 NANOPARTÍCULAS NA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS .....	31
2.2 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....	35
2.2.1 Miniemulsificação/Evaporação do Solvente e Dupla Emulsão/ Evaporação do Solvente .....	36
2.2.2 Polimerização em Miniemulsão e Miniemulsão Inversa.....	40
2.2.3 Polimerização interfacial em Miniemulsão Inversa .....	45
2.3 HIDROGÉIS POLIMÉRICOS .....	46
2.4 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO POR METÁTESE.....	50
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>57</b>
<b>3 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO POR ALTMET DE MONÔMERO DERIVADO DA L-LISINA E A OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREADORAS DE FÁRMACOS HIDROFÓBICOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1.1 Materiais.....	59
3.1.2 Síntese do monômero N,N'-bisacrilamida-etil-éster-L-lisina ....	60
3.1.3 Síntese de poli(bisacrilamida-L-lisina) e poli(fenil-fosfodiéster) via polimerização por ADMET em solução.....	60
3.1.4 Síntese de poli(bisacrilamida-L-lisina-co-fenil-fosfodiéster) via polimerização por ALTMET em solução.....	61
3.1.5 Síntese de poli(bisacrilamida-L-lisina-co-fenil-fosfodiéster) via polimerização por ALTMET em miniemulsão inversa.....	63

3.1.6	Preparação de nanopartículas de poli(bisacrilamida-L-lisina-co-fenil-fosfodiéster) via miniemulsificação/evaporação do solvente .....	64
3.1.7	Caracterização.....	65
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
3.2.1	Polimerização em solução.....	68
3.2.2	Polimerização interfacial em miniemulsão inversa.....	77
3.2.3	Miniemulsificação/evaporação do solvente .....	79
3.3	CONCLUSÕES .....	81

## **CAPÍTULO IV ..... 83**

### **4 SÍNTESE DE NANOGÉIS DERIVADOS DE ÁCIDO GLUTÂMICO CARREADORES DE FÁRMACOS HIDROFÍLICOS VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA ..... 83**

4.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	84
4.1.1	Materiais .....	84
4.1.2	Síntese do monômero N-acrilamida-L-ácido glutâmico (L-AGA).....	85
4.1.3	Síntese do poli(L-AGA) e poli(L-AGA-co-BIS) via polimerização em solução .....	86
4.1.4	Síntese dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) via polimerização em miniemulsão inversa.....	87
4.1.5	Ensaio de viabilidade celular dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) .....	89
4.1.6	Ensaio de hemólise .....	90
4.1.7	Caracterização.....	90
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	94
4.2.1	Polimerização em solução.....	94
4.2.2	Polimerização em miniemulsão inversa.....	102
4.3	CONCLUSÕES .....	111

## **CAPÍTULO V .....113**

### **5 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREADORAS DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS VIA DUPLA EMULSÃO SEM USO DE SOLVENTES ORGÂNICOS<sup>1</sup> .....113**

5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	114
5.1.1	Materiais.....	114
5.1.2	Preparação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	115
5.1.3	Caracterização das Nanopartículas.....	117
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	120
5.2.1	Efeito das condições de sonicação .....	120
5.2.2	Efeito do tipo e concentração de surfactante.....	122
5.2.3	Efeito do volume de água gelada .....	127
5.2.4	Efeito da concentração e composição de lipídio .....	129
5.2.5	Eficiência de Encapsulação.....	133
5.3	CONCLUSÕES .....	136
	<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>137</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE A – Espectros RMN das Reações ALTMET.....</b>	<b>155</b>



# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO

Um número crescente de trabalhos vem mostrando a potencial aplicabilidade de novos sistemas nanoestruturados para encapsulação e liberação sustentada de fármacos. De modo geral, quando administrado pelos métodos convencionais de terapêutica farmacológica, apenas uma fração da dose do fármaco é realmente aproveitada, geralmente porque o medicamento foi removido do sistema antes mesmo de atingir seu alvo. A encapsulação de fármacos em nanopartículas poliméricas e lipídicas apresenta meios de contornar este obstáculo. Através da proteção contra degradação prematura do fármaco nanoencapsulado, um aumento da biodisponibilidade e a maximização de sua atividade *in vivo* são observados.

Os métodos de obtenção das nanopartículas são vários e sua escolha reside no tipo de material empregado e nas características físico-químicas do fármaco que deverá ser encapsulado, bem como do seu sítio de ação e da duração da terapêutica (PANYAM; LABHASETWAR, 2003). A preparação das nanopartículas poliméricas pode acontecer *in situ* durante o processo de polimerização do monômero disperso, ou como uma etapa posterior ao processo de polimerização, a partir da precipitação do polímero pré-formado. De modo geral, todos os métodos de obtenção de nanopartículas que utilizam polímeros pré-formados podem ser adaptados e utilizados para preparação de nanopartículas lipídicas sólidas (ALMEIDA; SOUTO, 2007). A estratégia de preparação das nanopartículas deve ser escolhida com cuidado, uma vez que muitas das características finais das nanopartículas, tais como morfologia, carga de superfície e o diâmetro médio da partícula podem diretamente afetar a eficiência de encapsulação e a taxa de liberação do fármaco, bem como a interação das nanopartículas com a membrana celular (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Os procedimentos de encapsulação e vetorização de fármacos hidrofóbicos foram amplamente estudados e estão mais bem estabelecidos na literatura. Fármacos hidrossolúveis, por outro lado, necessitam de uma estratégia de encapsulação diferenciada dos demais fármacos de natureza hidrofóbica. A administração de fármacos hidrofílicos representa um desafio inclusive em sua forma convencional, dada a sua fragilidade, fácil degradação e oxidação *in vivo* e rápida

excreção renal (VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011). Consideráveis esforços têm sido feitos com a finalidade de identificar estratégias de encapsulação de fármacos hidrofílicos com elevada eficiência de encapsulação. O desafio maior reside em evitar a migração do fármaco para a fase aquosa durante o processo de preparação e/ou redispersão tendo em vista a falta de afinidade entre o fármaco e o polímero (ou lipídio), geralmente lipofílico.

Materiais poliméricos sintéticos há muito tornaram-se parte indispensável da sociedade moderna. Eles surgem como uma alternativa aos produtos de origem natural devido às suas propriedades mecânicas e térmicas, à sua durabilidade e estabilidade a longo prazo. No entanto, o esgotamento dos recursos fósseis e o aumento de sensibilização do público para o problema dos resíduos plásticos e o seu impacto sobre o meio ambiente têm gerado a necessidade por uma nova geração de polímeros biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis (MOHANTY; MISRA; HINRICHSEN, 2000; SHAH *et al.*, 2008). Além disso, materiais poliméricos biodegradáveis são de grande interesse para produção de materiais biologicamente úteis e encontram diversas aplicações na área biomédica como veículos carreadores de fármacos para liberação modificada, próteses temporárias para fins terapêuticos e na engenharia de tecidos artificiais, por exemplo (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Ainda que a utilização biomédica de polímeros naturais e biodegradáveis, tal como o colágeno, remonte milhares de anos, polímeros sintéticos biocompatíveis começaram a ser utilizados apenas em meados da década de 1960 (NAIR; LAURENCIN, 2007). Apesar de sua maior biodegradabilidade e biocompatibilidade, a utilização de polímeros naturais é muitas vezes limitada por sua baixa resistência mecânica e térmica, o que confere aos polímeros sintéticos maior destaque para esta aplicação. Um avanço significativo no desenvolvimento de novos polímeros biodegradáveis a partir de fontes renováveis vem sendo observado. Dada a complexidade e a gama de aplicações encontradas para esta classe de polímeros, não existe um único sistema polimérico disponível que possa ser considerado como o biomaterial ideal, o que reforça a necessidade de busca por novos polímeros que possam corresponder de forma adequada às necessidades específicas de cada tipo de aplicação (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

O custo da matéria prima é, muitas vezes, responsável por até 50% do custo global de produção de polímeros biodegradáveis (TSCHAN *et al.*, 2012). Diversos grupos de pesquisa têm concentrado esforços na

síntese de novos monômeros renováveis e na conversão destes em seus polímeros correspondentes. Isto, combinado à processos de síntese mais eficientes, seletivos e economicamente viáveis, certamente culminaria na redução dos custos de produção desta classe de polímeros. A biodegradabilidade dos polímeros pode ser manipulada pela inserção de grupos funcionais suscetíveis de hidrólise (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001), incluindo ésteres, anidridos, acetais, amidas, carbonatos, uretanos, ésteres fosfato, tioésteres e tiol ésteres. Historicamente, polímeros hidroliticamente sensíveis eram sintetizados predominantemente através de duas principais rotas, polimerização em etapas (policondensação, *i.e.* polianidridos e poliuretanos) e polimerização por abertura de anel (poli( $\alpha$ -ésteres)), sendo esta última limitada a monômeros cíclicos. Mais recentemente, a polimerização via radicais livres vêm sendo bastante explorada para síntese de hidrogéis biodegradáveis. Além disso, polímeros derivados de ácidos graxos, amino ácidos e carboidratos sintetizados via reações de polimerização do tipo ADMET (acyclic diene metathesis) e ROMP (ring-opening metathesis polymerization) estão também conquistando considerável espaço como polímeros biodegradáveis (BAUGHMAN; WAGENER, 2005; MARSICO et al., 2012; MEIER, 2009).

Nesse sentido, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de novos materiais poliméricos a partir de fontes renováveis e com potencial degradabilidade e biocompatibilidade para aplicação como sistemas nanoparticulados carreadores de fármacos visando sua liberação sustentada. Este trabalho ainda busca desenvolver novas estratégias de preparação de nanopartículas lipídicas para encapsulação simultânea de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos.

## 1.1 OBJETIVOS

A partir do exposto acima, este trabalho de doutorado tem como objetivo principal preparar nanopartículas poliméricas e lipídicas a partir da combinação de diferentes técnicas de preparação, visando à aplicação destas como sistemas de liberação sustentada de fármacos, em especial aqueles de caráter hidrofílico. Para tanto, novos materiais poliméricos sintetizados a partir de aminoácidos essenciais e não essenciais serão desenvolvidos. Assim, são objetivos específicos deste:

1. Sintetizar monômeros com grupamentos funcionais acrilamida a partir do ácido glutâmico e lisina;

2. Sintetizar e caracterizar polímeros e copolímeros à base de ácido glutâmico e lisina via polimerizações do tipo radicalar e ALTMET (*alternating diene metathesis*);
3. Preparar nanopartículas poliméricas utilizando as técnicas de polimerização em miniemulsão inversa e miniemulsificação/evaporação do solvente;
4. Preparar nanopartículas lipídicas a partir da combinação das técnicas de dispersão a quente e dupla emulsão/evaporação do solvente;
5. Avaliar a eficiência de encapsulação de compostos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos de cada sistema nanoparticulado desenvolvido.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Para facilitar a apresentação e compreensão, este trabalho foi estruturado em capítulos. Os procedimentos adotados, os resultados, discussões e conclusões foram divididos por assunto, e cada tema é apresentado separadamente em capítulos. O Capítulo I faz uma breve introdução ao trabalho, enfatizando seus objetivos e ambientando o leitor ao assunto abordado. O Capítulo II traz uma revisão da literatura com relação às técnicas utilizadas para preparação de nanopartículas poliméricas e lipídicas e a encapsulação de fármacos. No Capítulo III é descrita a síntese e copolimerização dos monômero *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato via reações ALTMET e a obtenção de nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisinaco-fenil-fosfodiéster) carreadoras de fármacos hidrofóbicos. No Capítulo IV é abordada a síntese de hidrogéis derivados de ácido glutâmico, com ênfase na preparação de nanogéis carreadores de fármacos hidrofílicos via polimerização em miniemulsão inversa. O Capítulo V traz o estudo acerca do desenvolvimento de uma adaptação da técnica de fusão/dupla emulsão para preparação de nanopartículas lipídicas sólidas de tamanho submicrométrico para encapsulação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. As conclusões gerais são apresentadas no Capítulo VI, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros que complementem o estudo. E, por último, são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas ao longo do trabalho.

## CAPÍTULO II

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 NANOPARTÍCULAS NA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS

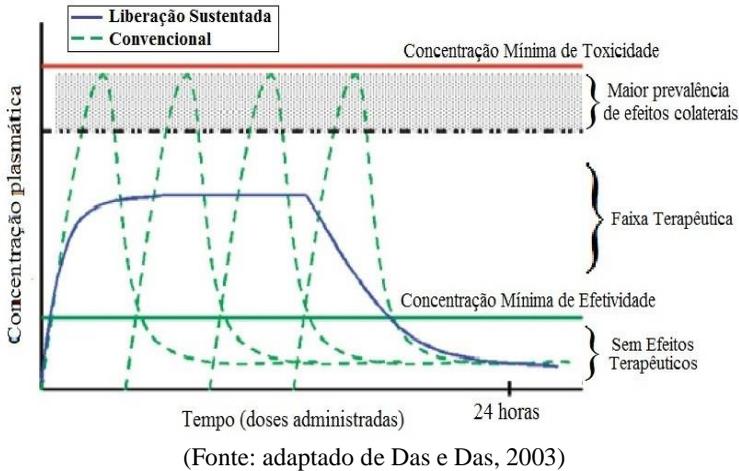
Nanopartículas poliméricas ou lipídicas são sistemas coloidais sólidos de tamanho submicrométrico. Não há, atualmente, um consenso entre a comunidade científica no que diz respeito à definição dos limites métricos das nanopartículas, existindo duas principais vertentes: aqueles que definem nanopartículas como estruturas com diâmetro na faixa de 1 – 100 nm e aqueles, inclusive este grupo de pesquisa, que concordam na definição que engloba na escala nanométrica todas as partículas menores que 1  $\mu\text{m}$ . O termo nanopartícula refere-se a dois tipos de estruturas, as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem segundo sua composição e organização estrutural. Nanoesferas são partículas sólidas maciças, enquanto nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório, onde uma fina parede polimérica/lipídica circunda um núcleo líquido oleoso ou aquoso.

Nos sistemas de liberação sustentada, as nanopartículas atuam como veículos carreadores de compostos bioativos, que podem estar encapsulados na matriz polimérica ou adsorvidos na superfície da partícula. As nanopartículas atuam também como agentes de proteção contra degradação enzimática do fármaco *in vivo*, e ainda tornam possível (1) o direcionamento do fármaco a um conjunto específico de células ou tecidos; (2) o aumento da permeabilidade do fármaco através de barreiras epiteliais e endoteliais e (3) a coadministração de dois ou mais fármacos para combinação de terapêuticas (FAROKHZAD; LANGER, 2009; FERRARI, 2005).

De maneira geral, a faixa de ação terapêutica de um fármaco está compreendida entre a concentração mínima de efetividade (CME) e a concentração mínima de toxicidade (CMT), onde abaixo da CME o ativo se torna ineficaz e acima da CMT, tóxico (UCHIZONO, 2005). O objetivo de um sistema de liberação sustentada é manter a concentração do fármaco entre esses dois níveis (faixa terapêutica) por um tempo prolongado (Figura 1). As características típicas de liberação lenta e sustentada das nanopartículas, assim como a viabilidade de aplicação através de variadas rotas de administração, favorecem a manutenção da concentração de fármaco dentro da faixa terapêutica indicada, além de

proporcionarem uma diminuição do número de doses requeridas para manutenção da concentração terapêutica e um consequente alívio dos efeitos adversos associados (ALLEN; CULLIS, 2004; CHELLAT et al., 2005; PANYAM; LABHASETWAR, 2003)

**Figura 1** - Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: administração convencional vs. sustentada.



Um sistema de nanopartículas carreadoras de fármaco bem-sucedido é aquele com uma elevada capacidade de aprisionamento de fármaco, de modo a reduzir a quantidade de carreadores requerida para administração do fármaco na concentração desejada (SOPPIMATH et al., 2001). O aprisionamento do fármaco nas nanopartículas pode se dar através de dois métodos: pela incorporação do fármaco durante o processo de produção das nanopartículas ou pela adsorção do fármaco nas nanopartículas já formadas, incubando-as numa solução concentrada que contém o fármaco. Além da ordem de adição do fármaco na formulação (incorporação ou adsorção), vários outros fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, a natureza do fármaco e do polímero/lipídio, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a natureza do óleo utilizado (no caso das nanocápsulas), o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica e as condições do método de preparação das nanopartículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Uma vez que o fármaco tenha sido administrado no organismo por meio de um sistema de liberação sustentada, o mecanismo de liberação depende de fatores como: (1) da razão entre a dessorção e adsorção do fármaco da superfície das partículas; (2) da difusão pela matriz polimérica/lipídica das nanoesferas; (3) da difusão através da parede das nanocápsulas; (4) do intumescimento da matriz polimérica; (5) da erosão/degradação da matriz polimérica/lipídica; ou (6) por uma combinação entre o processo de erosão e difusão (PEZZINI et al., 2007; SOPPIMATH et al., 2001). O processo de dessorção é responsável pela rápida liberação inicial do agente farmacêutico devido à fração que está adsorvida ou fracamente ligada a grande área superficial total das nanopartículas (“burst release”). Após este período, a taxa de liberação do fármaco, que se apresenta de forma mais sustentada e lenta, é controlada principalmente pelo processo de difusão do fármaco, intumescimento ou erosão do polímero/lipídio, ou ainda, a combinação destes (SOPPIMATH et al., 2001).

Sistemas nanoestruturados para liberação sustentada de fármacos têm sido muitas vezes criticados em função de suas qualidades farmacêuticas e comerciais, principalmente devido ao alto custo de produção, complexidade, estabilidade durante armazenamento e registros de propriedade intelectual. Ainda que os custos do tratamento por sistemas de liberação controlada sejam mais elevados, uma análise de custo mais cuidadosa, que leva também em consideração os custos relacionados ao tratamento dos efeitos colaterais associados, mostra que os sistemas de liberação controlada podem ser economicamente competitivos com os sistemas convencionais de terapêutica (ALLEN; CULLIS, 2004).

Algumas formulações de nanocarreadores, em sua maioria sistemas lipossomais utilizados para o tratamento de câncer, estão em testes clínicos ou já se encontram disponíveis no mercado, (COUVREUR, 2013; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). Doxorubicina encapsulada em nanopartículas de poli(alquil-cianoacrilato) (PACA), Livatag®, está atualmente em ensaios clínicos de fase III e apresenta potencial aplicação no tratamento de hepatocarcinoma em pacientes em estágios avançados e com resistência ou intolerância à Sorafenibe (fármaco também utilizado no tratamento de câncer de fígado). Os resultados da fase II revelaram um aumento do tempo médio de sobrevida dos pacientes tratados com Livatag® para 31,7 meses em comparação aos 15 meses do grupo de controle tratado com a terapêutica convencional (BIOALLIANCE PHARMA, 2011). Nanopartículas de albumina ligada

a Paclitaxel, Abraxane®, atualmente em uso clínico para o tratamento do câncer de mama metastático, apresentam como vantagem a diminuição do tempo de infusão e da quantidade de doses requeridas (COUVREUR, 2013; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

A rifampicina (utilizada como fármaco modelo hidrofóbico neste trabalho), é um fármaco de primeira escolha utilizado no tratamento da tuberculose (TB). A TB é uma doença infecto-contagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, e acomete principalmente os pulmões, podendo disseminar-se para outros órgãos ou tecidos. Apesar de ser uma doença curável e evitável por meio de vacina, a TB continua sendo um grande problema de saúde pública. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2015) a tuberculose é, junto com a AIDS, a doença infecciosa que mais mata no mundo. O esquema de tratamento da tuberculose recomendado pela OMS e Ministério da Saúde (Brasil) desde agosto de 2008 é o chamado 2RHZE/4RH de curta duração, composto pela utilização dos fármacos Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z), e Etambutol (E) na primeira fase do tratamento durante dois meses, seguidos de Rifampicina e Isoniazida durante quatro meses, geralmente com doses diárias (MS, 2014). Um dos maiores obstáculos no tratamento da tuberculose, contudo, é o abandono do paciente à terapia devido ao longo período de tratamento e ao grande número de doses. Nesse sentido, o uso de nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos apresenta um grande potencial no tratamento da tuberculose, uma vez que suas características típicas de liberação lenta e sustentada, bem como seu tamanho submicrométrico, favorecem o aumento da biodisponibilidade do fármaco e a redução da frequência de doses, atenuando os problemas com a adesão do paciente à terapia.

Doxorrubicina (utilizada como fármaco modelo hidrofílico neste trabalho) vem sendo utilizada há mais de 50 anos no tratamento de uma variedade de cânceres, incluindo carcinomas esofágicos, gástricos, pulmonar, hepáticos e de seio, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, sarcomas de Kaposi etc. A ampla atividade anticancerígena da doxorrubicina é atribuída à sua capacidade de inibir a replicação celular, devido à formação de um complexo estável com a molécula de DNA, dificultando sua a síntese. A terapêutica com doxorrubicina, no entanto, é acompanhada por efeitos colaterais adversos, que incluem mielossupressão (diminuição na produção total de células sanguíneas), neutropenia (diminuição do número de neutrófilos circulantes), síndrome mão-pé (vermelhidão, inchaço e dor nas palmas das mãos ou nas plantas dos pés), risco de desenvolvimento de leucemias secundárias e

insuficiência cardíaca induzida por antraciclina (BROWN; BRANNON-PEPPAS, 2007; MINOTTI et al., 2004; NAWARA; KRYSINSKI; BLANCHARD, 2012). O desenvolvimento de sistemas carreadores de doxorubicina para liberação prolongada tem sido o foco de diversos estudos, visando, principalmente, o aumento da biodisponibilidade do fármaco e o alívio dos efeitos colaterais tóxicos associados (BROWN; BRANNON-PEPPAS, 2007; KALARIA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; SAFRA et al., 2000; SOUSA-HERVES; WEDEPOHL; CALDERO, 2015).

## 2.2 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Convencionalmente, nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de dois principais métodos: dispersão do polímero pré-formado e polimerização do monômero *in situ*. Os processos de polimerização do monômero, mesmo quando em uma fase aquosa, geralmente conduzem a polímeros pouco biodegradáveis ou não biodegradáveis (NAIR; LAURENCIN, 2007). Métodos que utilizam polímeros pré-formados ou lipídios sólidos ao invés de monômeros também vêm sendo utilizados, ainda que, em muitos dos casos, seja necessário o uso de solventes orgânicos para a dissolução dos polímeros e lipídios, o que abre espaço para o surgimento de eventuais problemas toxicológicos proveniente de resíduos de solvente presente na dispersão de nanopartículas. De maneira geral, todos os métodos de obtenção de nanopartículas que utilizam polímeros pré-formados podem ser adaptados e utilizados para preparação de nanopartículas lipídicas (ALMEIDA; SOUTO, 2007; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

É de crucial importância o conhecimento dos parâmetros experimentais (solvente orgânico, temperatura, tipo de estabilizador e iniciador, tipo e velocidade de agitação etc.) envolvidos na preparação das nanopartículas e o efeito que cada parâmetro pode produzir individualmente e em conjunto nas características finais das partículas (LASSALLE; FERREIRA, 2007). O método de preparação escolhido tem influência direta sobre muitas das características finais das nanopartículas, tais como o tamanho e a distribuição do tamanho de partícula, massa molar do polímero, carga superficial das partículas, eficiência de encapsulação e a taxa de liberação do fármaco (FREITAS;

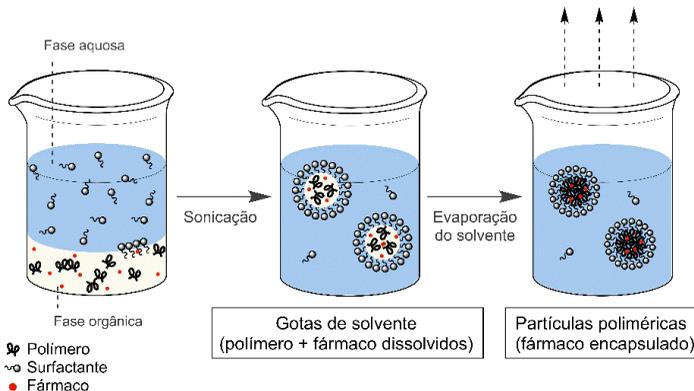
MERKLE; GANDER, 2005).

Uma técnica apropriada de preparação de sistemas poliméricos desenvolvidos para a liberação sustentada de fármacos deve atender a alguns requisitos (PARK; YE; PARK, 2005); (1) a estabilidade química e a atividade biológica do fármaco incorporado devem ser mantidas durante o processo de encapsulação; (2) a eficiência de encapsulação e o rendimento das partículas devem ser altos o suficiente para produção em larga escala (3) a faixa de diâmetro deve ser compatível com a via de administração; e (4) o perfil de liberação do fármaco deve ser reprodutível.

### 2.2.1 Miniemulsificação/Evaporação do Solvente e Dupla Emulsão/Evaporação do Solvente

Como descrito por Freitas e colaboradores (2005), a preparação de nanopartículas a partir da técnica de emulsificação com evaporação do solvente (sistemas do tipo óleo em água) ocorre, basicamente, em três etapas principais (Figura 2): (I) o polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico volátil e imiscível em água; (II) a fase orgânica resultante é então emulsificada em uma fase aquosa na presença de um surfactante; e, por último, (III) o solvente orgânico é extraído da emulsão através da evaporação com elevação da temperatura ou agitação, levando à precipitação do polímero e à consequente formação das partículas sólidas contendo o fármaco.

**Figura 2** - Representação do método de miniemulsificação/evaporação do solvente.



(Fonte: produção do autor)

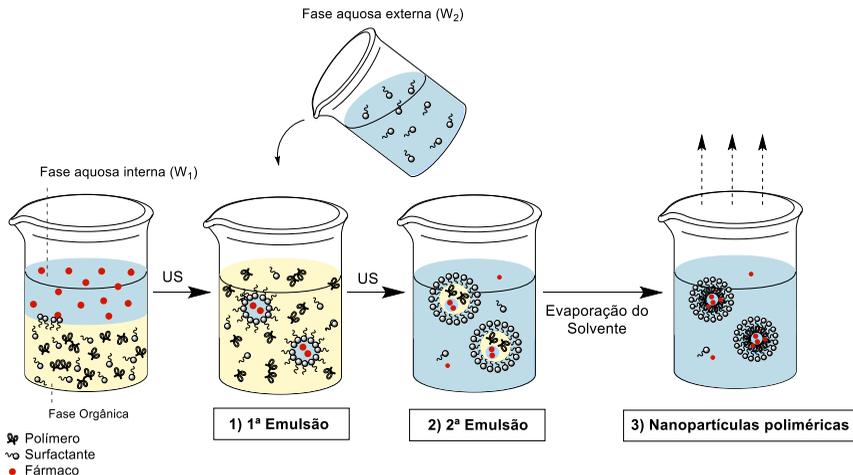
Quando a emulsificação das fases orgânica e aquosa se dá na presença de um equipamento de dispersão de alta eficiência como uma sonda de ultrassom, resultando em partículas submicrométricas, a técnica é denominada miniemulsificação/evaporação do solvente e se diferencia da emulsificação/evaporação do solvente pelo tamanho inicial das gotas precursoras das partículas, que são micrométricas no caso da emulsificação.

O tamanho das nanopartículas e a eficiência de encapsulação podem ser controlados pelo ajuste da taxa de agitação, quantidade do agente emulsificante, viscosidade das fases orgânica e aquosa, e concentração de polímero e fármaco (LASSALLE; FERREIRA, 2007; O'DONNELL; MCGINITY, 1997). Musyanovych e colaboradores (2008) mostraram que a massa molar e a concentração de polímero (PLA, PLGA e PCL) e surfactante (SDS, Lutensol, Pluronic e CTMA-Cl) utilizados exercem também importante efeito sobre as características finais das nanopartículas preparadas via técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Os autores observaram que o tamanho das nanopartículas obtidas aumentou concomitantemente com a concentração e a massa molar dos polímeros. A respeito do tipo de surfactante, os autores observaram que surfactantes iônicos de baixa massa molar e carregados negativamente (SDS) ou positivamente (CTMA-Cl) possuem efeito estabilizante muito superior aos surfactantes não-iônicos (Lutensol e Pluronic), e resultaram em nanopartículas menores. Além disso, a eficiência de encapsulação do PMI, um corante fluorescente hidrofóbico, foi maior em nanopartículas preparadas com SDS do que naquelas preparadas com Lutensol. Os resultados obtidos por Peres (2012) indicam que a hidrofobicidade do polímero também tem efeito sobre a eficiência de encapsulação de fármacos. O autor observou que um fármaco hidrofóbico análogo a isoniazida foi mais eficientemente encapsulado em nanopartículas blenda de PLLA/PMMA ricas em PMMA, de natureza mais hidrofóbica que o PLLA. Segundo Izumikawa e colaboradores (1991), o processo de evaporação do solvente, evaporação rápida sob pressão reduzida ou evaporação lenta sob pressão atmosférica, pode também influenciar a eficiência de encapsulação. Os autores obtiveram eficiência de encapsulação menor nas nanopartículas preparadas sob lenta evaporação, alcançando valores máximos de 60%, enquanto que nas nanopartículas preparadas sob rápida evaporação a eficiência alcançou valores máximos de 72%.

A técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente aplica-se, contudo, somente a encapsulação de fármacos hidrofóbicos. Uma

variação da técnica permite a encapsulação de fármacos hidrofílicos com maior eficiência em relação à miniemulsificação convencional. A dupla ou múltipla emulsão é geralmente preparada em duas etapas (Figura 3). A primeira etapa consiste na formação da miniemulsão primária (emulsão inversa, água em óleo) através da emulsificação de uma fase aquosa contendo o fármaco em uma fase orgânica contendo o polímero e um surfactante de baixo HLB (Hydrophilic-lipophilic balance). Na segunda etapa, a emulsão primária é miniemulsificada em uma solução aquosa contendo um surfactante de alto HLB (emulsão água em óleo em água). Com a subsequente evaporação do solvente, as nanocápsulas com núcleo aquoso são formadas (LASSALLE; FERREIRA, 2007; PAL, 2007).

**Figura 3** - Representação do método de dupla miniemulsificação/evaporação do solvente.



(Fonte: produção do autor)

Em um estudo comparativo entre as técnicas de miniemulsificação convencional e dupla emulsão, Zhang e colaboradores (2006) avaliaram a eficiência de encapsulação de insulina em nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico. Os autores observaram que de maneira geral, a dupla emulsão foi mais eficiente na encapsulação da insulina. Da fração encapsulada, aproximadamente 55% da proteína ficou adsorvida/retida na superfície das nanopartículas preparadas via dupla emulsão, contra 67% nas nanopartículas preparadas via miniemulsificação convencional. Na comparação entre as técnicas de múltipla emulsão e nanoprecipitação

para encapsulação de proteínas (insulina e lisozima) em nanopartículas de PLGA, Bilati, Allémann e Doelker (2005) observaram que a múltipla emulsão foi mais eficiente na encapsulação de ambas as proteínas, alcançando eficiência de encapsulação superior a 24,1% e 84,4%, respectivamente para insulina e lisozima, contra 13,5% e 40% obtido por nanoprecipitação. Por outro lado, via nanoprecipitação foram obtidas nanopartículas muito menores, com diâmetro médio máximo de 173 nm e 279 nm, respectivamente, contra os 1402 nm e 967 nm obtidos por múltipla emulsão.

Na literatura é possível encontrar um grande número de trabalhos que utilizam a técnica de dupla emulsão para encapsular compostos hidrofílicos, principalmente aqueles de alta massa molar como as proteínas, por exemplo, uma vez que altas temperaturas podem ser facilmente evitadas na produção de nanopartículas via esta técnica (ALMEIDA; SOUTO, 2007). Contudo, a encapsulação de compostos hidrofílicos de baixa massa molar com elevada eficiência de encapsulação ainda não está bem elucidada na literatura. O desafio maior reside em evitar a migração do fármaco para a fase aquosa durante o processo de preparação, redispersão e/ou estocagem, tendo em vista que a difusão de compostos hidrofílicos de baixa massa molar para a fase aquosa é ainda mais facilitada em virtude do tamanho reduzido da molécula.

Segundo Khoe e Yaghoobian (2009), os surfactantes têm papel duplo na múltipla emulsificação: formação de uma barreira na interface interna da partícula contra liberação prematura do fármaco e como estabilizador estérico da interface externa. Os autores observaram variações de eficiência de encapsulação de penicilina-G entre 21,8 e 76,8% em nanopartículas de poli(adipato de butila) (PBA) preparadas com diferentes concentrações de surfactante. De maneira geral, quanto maior a concentração de Span e Tween, maior a eficiência de encapsulação da penicilina-G. Segundo os autores, a introdução de Span (HLB 1.8) como surfactante interno criou uma barreira hidrofílica na fase interna, tornando-a mais bem selada. Já o aumento da concentração de Tween (HLB 15.0) promoveu o aumento da viscosidade da fase externa, dificultando a difusão do fármaco e contribuindo para o aumento da encapsulação do fármaco. Por outro lado, Ubrich e colaboradores (2004) prepararam nanopartículas de PLGA, PCL e Etilcelulose (EC) carregadoras de propranolol utilizando agente emulsificante apenas na segunda emulsão. Os autores observaram, contudo, um decréscimo do tamanho de partícula e um aumento da eficiência de encapsulação quando uma maior quantidade de fármaco foi utilizada, indicando que, neste caso, o fármaco atuou também como surfactante primário, auxiliando na

estabilização da emulsão primária e dificultando a rápida coalescência das gotas.

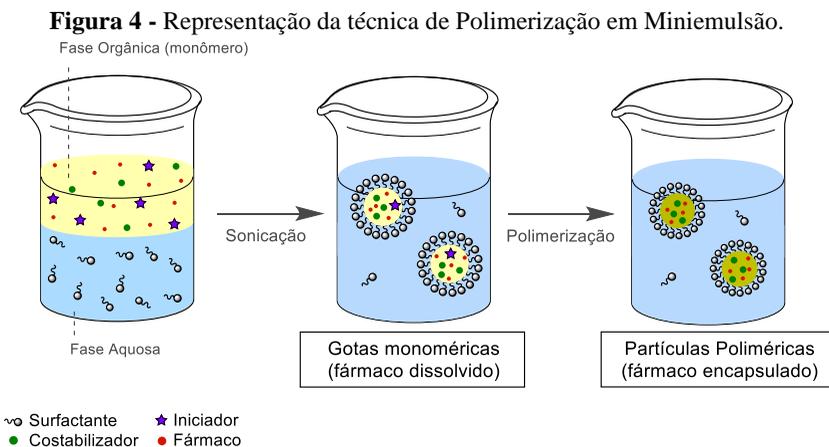
Sob a perspectiva de encapsulação de drogas hidrofóbicas e hidrofílicas, as técnicas de emulsificação/evaporação do solvente e dupla emulsão/evaporação de solvente são amplamente utilizadas para alcançar satisfatória eficiência de encapsulação em ambas nanopartículas poliméricas e lipídicas. No entanto, a utilização de solventes orgânicos potencialmente tóxicos é geralmente necessário, o que pode criar problemas toxicológicos resultantes de resíduo de solventes, dado que a remoção completa do solvente é muitas vezes difícil (MEHNERT; MÄDER, 2001). No preparo de nanopartículas lipídicas sólidas, este problema pode ser contornado através de uma adaptação da técnica, onde o lipídio fundido é utilizado como fase orgânica ao invés de uma solução de lipídio dissolvido num solvente orgânico. Na versão adaptada da técnica, a recém preparada miniemulsão ou dupla emulsão é adicionada a um grande volume de água gelada para promover a solidificação do lipídio e formação das partículas sólidas. Utilizando a técnica de fusão/dupla emulsão, Bodmeier e colaboradores (1992) e Reithmeier e colaboradores (2001) prepararam com sucesso micropartículas lipídicas sólidas carreadoras de pseudoefedrina HCl e peptídeos, respectivamente, com alta eficiência de encapsulação e perfil de liberação sustentada. Pouco se sabe, contudo, sobre a utilização desta técnica para preparação de partículas lipídicas sólidas de tamanho submicrométrico ( $<1 \mu\text{m}$ ).

### **2.2.2 Polimerização em Miniemulsão e Miniemulsão Inversa**

Classicamente, miniemulsões são definidas como dispersões aquosas de gotas de óleo relativamente estáveis, de diâmetro na faixa de 50 - 500 nm, preparadas a partir da homogeneização de um sistema contendo óleo, água, surfactante e co-estabilizador. A polimerização de miniemulsões cuidadosamente preparadas resulta em um látex de partículas sólidas de tamanho aproximadamente igual ao das gotas iniciais (LANDFESTER et al., 1999). Em uma miniemulsão ideal, existe uma correspondência de 1:1 entre gotas de monômero iniciais e partículas poliméricas sólidas finais (SCHORK et al., 2005).

O preparo da miniemulsão começa com uma etapa de homogeneização, onde a fase orgânica dispersa (monômero, co-estabilizador, fármaco e outros aditivos) e a fase aquosa contínua (água e emulsificante) são misturadas sob agitação vigorosa a fim de obter gotas de tamanho micrométrico. Então, um mecanismo de alto cisalhamento é

aplicado, tal como a sonicação, e gotas de tamanho submicrométrico são obtidas (ASUA, 2002). Concomitantemente com o aumento do tempo de sonicação, as gotas diminuem em tamanho e a dispersabilidade estreita-se até que o estado estacionário seja alcançado, o qual é caracterizado por um equilíbrio dinâmico entre a taxa de fusão e cisão das gotas (LANDFESTER; WILLERT; ANTONIETTI, 2000; LANDFESTER, 2001). As nanogotas de monômero são o lócus primário da polimerização, onde cada gota torna-se o meio reacional, independente umas das outras. Assim, cada gota se comporta como um “nanoreator”. Nas reações de polimerização em miniemulsão, ambos iniciadores hidrofílicos e hidrofóbicos podem ser utilizados. (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; SCHORK et al., 2005). A Figura 4 apresenta o princípio básico do processo de polimerização em miniemulsão.



(Fonte: produção do autor)

Devido à grande área superficial total das gotas, a maior parte do surfactante presente encontra-se adsorvido na superfície das gotas, não havendo surfactante em excesso para a formação de micelas. Dessa forma, a polimerização pode ocorrer predominantemente nas nanogotas monoméricas, e o mecanismo de nucleação homogênea é minimizado. O tamanho das gotas iniciais de monômero e das partículas poliméricas resultantes depende principalmente da quantidade de emulsificante utilizada (SCHORK et al., 2005). A estabilidade de miniemulsões é de extrema importância devido ao fato desta influenciar na nucleação das gotas e, por essa razão, tanto a estabilidade no período entre a formação da miniemulsão e a polimerização, quanto durante o processo de

polimerização, devem ser controladas e acompanhadas.

A princípio, existem duas maneiras pelas quais uma emulsão pode degradar: (1) pelo processo de coalescência entre as nanogotas e/ou (2) através da degradação difusional (Ostwald ripening), um processo no qual o monômero difunde das gotas menores para as maiores, levando a um aumento do tamanho médio das gotas. A coalescência das gotas pode ser evitada através da adição de quantidades suficientes de surfactante. Já a degradação difusional das gotas pode ser eficientemente inibida através da adição de um co-estabilizador (agente hidrofóbico) ao sistema, o qual promove o aumento da pressão osmótica dentro das gotas. A degradação difusional é suprimida quando é estabelecido o equilíbrio entre a pressão osmótica interna e a pressão de Laplace externa, que é maior quanto menor o tamanho da gota (LANDFESTER, 2001, 2006; SCHORK et al., 2005).

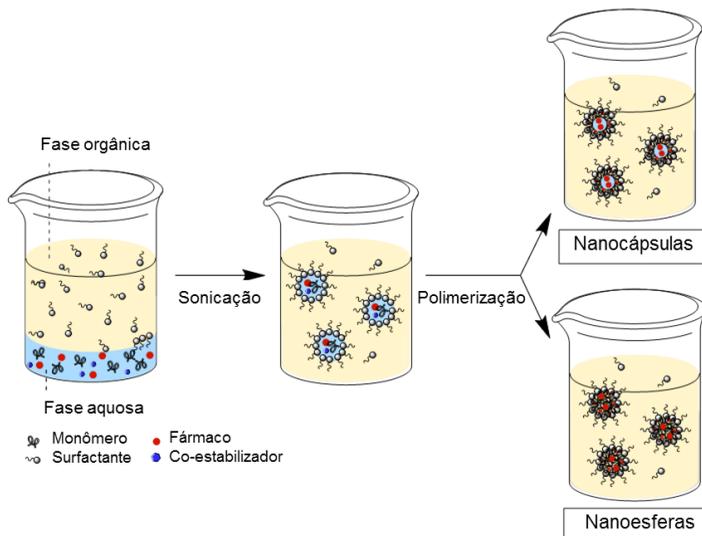
Diversos trabalhos disponíveis na literatura vêm mostrando que as características da polimerização em miniemulsão apresentam vantagens em relação às outras técnicas, tais como suspensão e emulsão, quando utilizada como um método de encapsulação (FONTENOTT & SCHORK, 1993; TIARKS; LANDFESTER & ANTONIETTI, 2001; ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002; PARK & KIM, 2005). Tal idealização se deve, principalmente, ao fato de a miniemulsão gerar duas fases imiscíveis, uma delas formada por pequenas gotas estáveis de monômero (contendo o composto a ser encapsulado), as quais são nucleadas e sofrem a polimerização, resultando no látex final. Sendo o transporte de massa no meio reacional minimizado, as características da miniemulsão são mantidas desde a dispersão até a obtenção das nanopartículas sólidas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

Utilizando a técnica de polimerização em miniemulsão, Romio *et al.* (2009) e Steinmacher *et al.* (2010) obtiveram nanocápsulas poliméricas biocompatíveis de PMMA, que se mostram interessantes para aplicações biomédicas como sistemas carreadores de óleos. Bernardy *et al.* (2010) encapsularam quercetina, um flavonoide com propriedade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória. Peres (2012) encapsulou um análogo hidrofóbico da isoniazida em nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA. Romio *et al.* (2013) e Staudt *et al.* (2013) encapsularam nanopartículas de níquel em partículas de poliacrilamida e PMMA, respectivamente, obtendo nanopartículas orgânicas-inorgânicas que combinam as características dos látexes poliméricos e das nanopartículas magnéticas. Cardoso *et al.* (2013) obtiveram nanocápsulas de poliestireno encapsulando óleos vegetais que, além de serem promissores para a veiculação de compostos ativos

hidrofóbicos, apresentam uma série de propriedades antioxidante, anti-inflamatória, emoliente, anestésica e repelente. Valério *et al.* (2013) prepararam nanopartículas de poli(uréia-uretano) contendo óleo de açaí, um óleo vegetal com boas propriedades regenerativas e antioxidantes.

A técnica de polimerização em miniemulsão é, contudo, eficiente para encapsulação de substâncias hidrofóbicas. Uma adaptação da miniemulsão direta, a miniemulsão inversa, permite produzir nanocápsulas com núcleo aquoso, as quais são de extrema importância para a proteção, estocagem e liberação de compostos hidrofílicos. A miniemulsão inversa pode ser preparada a partir da sonicação de uma fase aquosa dispersa (monômero hidrofílico, água, e co-estabilizador) e uma fase orgânica contínua (solvente orgânico e surfactante) (CAPEK, 2010). Todavia, o problema essencial na preparação de miniemulsões inversas é a estabilidade antes e durante a polimerização das nanogotas monoméricas. Em relação à miniemulsão direta, a miniemulsão inversa tende a apresentar menor estabilidade das nanogotas, uma vez que a parte apolar da molécula do surfactante é a responsável pelo efeito estérico que minimiza a coalescência das partículas, enquanto que na miniemulsão direta a parte polar da cadeia do surfactante evita a coalescência das partículas pelos efeitos estérico e eletrostático. A Figura 5 apresenta o princípio básico do processo de polimerização em miniemulsão inversa.

**Figura 5** - Representação da técnica de Polimerização em Miniemulsão Inversa.



(Fonte: produção do autor)

Com a finalidade de aumentar a estabilidade da miniemulsão inversa, um agente lipofóbico (co-estabilizador) é aplicado, o qual retarda a degradação difusional monomérica das nanogotas e mantém a estabilidade das pequenas gotas geradas na etapa de homogeneização do sistema. Em miniemulsões inversas, sais são extensamente aplicados como agentes lipofóbicos, sendo os sais de sódio os usualmente utilizados (CAO et al., 2010). Devido à presença destes agentes lipofóbicos, também denominados agentes osmóticos, a energia de Gibbs nas nanogotas é diminuída e, dessa forma, diminui-se a força motriz que levaria à difusão do monômero para a fase contínua, minimizando a degradação difusional (CAPEK, 2010). Além de estabilizar a pressão osmótica no interior das nanogotas, os sais hidrofílicos em miniemulsões inversas também influenciam fortemente as propriedades interfaciais entre a fase contínua e a fase dispersa. As tensões interfaciais entre polímero/solvente orgânico e polímero/solução salina se tornam menores que a tensão interfacial entre solvente orgânico/solução salina. Por conseguinte, as moléculas poliméricas se difundem para a interface fase orgânica/solução salina com o objetivo de diminuir a energia livre de Gibbs do sistema. Nestas condições observa-se a formação de nanocápsulas com núcleo aquoso (CAO; ZIENER; LANDFESTER, 2010).

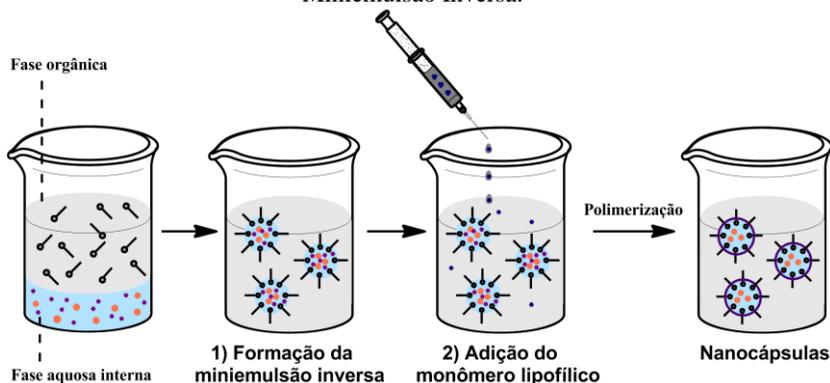
As nanopartículas obtidas via miniemulsão inversa encontram-se dispersas em um solvente orgânico, geralmente tóxico. Dessa forma, para fins biomédicos, é necessário que as partículas sejam redispersas em água ou numa solução aquosa contendo surfactante (CRESPY et al., 2007). Geralmente, após a redispersão do látex em água, o solvente é removido por evaporação. Este procedimento geralmente tem efeito mínimo sobre o diâmetro médio final das nanopartículas.

Baseados em análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Cao; Ziener e Landfester (2010) foram os primeiros a analisar a síntese de nanopartículas com núcleo aquoso a partir de polimerização em miniemulsão inversa. A análise foi de extrema importância para avaliação da morfologia das nanopartículas de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) obtidas. Os autores observaram que, a partir da polimerização da acrilamida, a morfologia final resultante é de nanoesferas. Tal fato se deve a hidrossolubilidade do polímero formado na fase dispersa. Segundo Tiarks; Landfester e Antonietti (2001), a imiscibilidade do polímero formado na fase dispersa é o principal fator responsável para a formação de nanocápsulas.

### 2.2.3 Polimerização interfacial em Miniemulsão Inversa

A técnica de polimerização interfacial em miniemulsão inversa compartilha dos mesmos princípios da polimerização em miniemulsão inversa clássica. Na polimerização interfacial, a síntese de nanocápsulas é governada pela precipitação do polímero na interface das nanogotas. Neste caso, nanocápsulas com núcleo aquoso são obtidas através de uma reação em duas etapas (Figura 6). A primeira etapa consiste na formação de uma miniemulsão inversa, onde são obtidas nanogotas aquosas (água, monômero hidrofílico e fármaco) dispersas em uma fase contínua orgânica. A segunda etapa do processo envolve a adição de um segundo monômero, de caráter lipofílico, à fase contínua orgânica. A reação de polimerização dos monômeros ocorre, então, na interface água/óleo, onde o polímero precipita, formando uma casca polimérica ao redor do núcleo aquoso (VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011).

**Figura 6** - Representação da técnica de Polimerização Interfacial em Miniemulsão Inversa.



(Fonte: produção do autor)

Baier e colaboradores (2010) sintetizaram nanopartículas de amido reticulado via polimerização interfacial em miniemulsão inversa através da reação entre as hidroxilas presentes no amido solubilizado na fase aquosa (gotas) com o diisocianato disperso na fase contínua orgânica contínua. Utilizando esta mesma técnica, Steinmacher et al., (2013) alcançaram elevada eficiência de encapsulação (acima de 70%) de Sulfurodamina 101, um corante hidrofílico fluorescente, em nanocápsulas de amido reticulado com núcleo aquoso, mesmo após redispersão em água. Os autores ainda observaram que a permeabilidade da casca

polimérica das nanocápsulas pode ser facilmente modificada pelo grau de reticulação do polímero, sugerindo que o tempo de liberação do fármaco pode ser modulada, apenas com ajustes reacionais, conforme necessidade.

### 2.3 HIDROGÉIS POLIMÉRICOS

Hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas hidrofílicas reticuladas capazes de absorver grandes quantidades de água (até milhares de vezes o seu peso seco) ou fluidos biológicos sem perder sua configuração tridimensional. (HAMIDI; AZADI; RAFIEL, 2008; HOFFMAN, 2002; PEPPAS; KHARE, 1993). Hidrogéis podem ser projetados de maneira a assumir diferentes formas físicas, incluindo filmes, partículas, micropartículas e nanopartículas (comumente denominadas de nanogéis).

O processo de intumescimento de um hidrogel é governado por fatores físicos intrínsecos à rede 3D e a fatores externos. Alguns fatores físicos, tais como a presença de grupamentos funcionais hidrofílicos ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CONH}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) na estrutura da cadeia polimérica, menor densidade de reticulação e uma alta flexibilidade da rede polimérica contribuem positivamente para um maior intumescimento do material. Por outro lado, a presença de grupos hidrofóbicos, maior densidade de reticulação e a presença de íons desfavorecem a absorção de água pelo gel. Mudanças de pH, força iônica, temperatura e composição de solvente são alguns dos fatores externos que interferem no processo de absorção de água pelo gel (BRITO et al., 2013; GUPTA; VERMANI; GARG, 2002; PEPPAS; KHARE, 1993).

Os hidrogéis podem ser classificados em duas categorias principais segundo o tipo de reticulação: (1) fisicamente, e (2) quimicamente reticulados. Hidrogéis físicos são assim denominados quando as cadeias poliméricas são mantidas juntas por emaranhamento das cadeias poliméricas e/ou por forças secundárias não-covalentes, incluindo forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (HOFFMAN, 2002). Estas interações intermoleculares formam, na verdade, zonas de junção ao invés de ligações de reticulação. Uma vez que estas zonas de junção não estão conectadas covalentemente, elas apresentam um comportamento reversível e podem ser facilmente quebradas através de mudanças no ambiente (NAM; WATANABE; ISHIHARA, 2002). Os hidrogéis químicos, por outro lado, são aqueles que possuem ligações cruzadas covalentes. Agentes reticulantes bi- ou multifuncionais, tais como monômeros divinílicos e diisocianatos são

geralmente utilizados na construção dos hidrogéis reticulados quimicamente (HOFFMAN, 2002; KLINGER; LANDFESTER, 2012). De uma maneira geral, hidrogéis formados por ligações cruzadas covalentes são caracterizados por uma maior estabilidade estrutural em relação aos hidrogéis reticulados fisicamente.

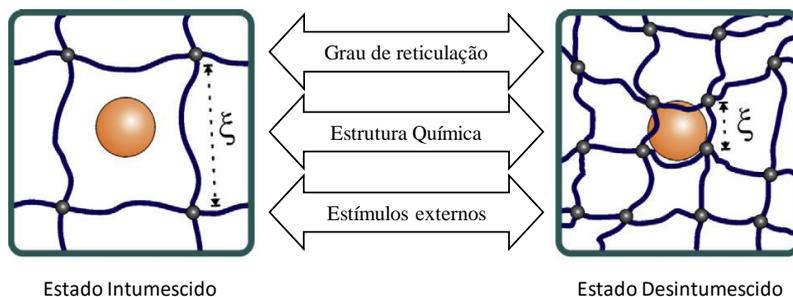
Hidrogéis podem ser preparados a partir de praticamente qualquer polímero solúvel em água, abrangendo uma vasta gama de composições químicas e propriedades físicas. Ambos polímeros sintéticos (incluindo PEG-PLA-PEG, PHB, PNIPAAm, PHEMA) e naturais (incluindo quitosana, colágeno, agarose, dextrana, polilisina, pectina) podem ser utilizados na preparação de hidrogéis. Hidrogéis de origem natural são geralmente atóxicos, biocompatíveis e apresentam uma série de propriedades físico-químicas que os tornam adequados para diferentes aplicações biomédicas. Contudo, polímeros naturais geralmente provocam reações inflamatória e imunogênica. Além disso, apresentam propriedades mecânicas inferiores à dos polímeros sintéticos. Por outro lado, hidrogéis de polímeros sintéticos são geralmente biologicamente inertes, com propriedades previsíveis e reprodutíveis de batelada para batelada e apresentam cinética de degradação bem estabelecida (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; NAIR; LAURENCIN, 2007).

A biocompatibilidade dos hidrogéis está atrelada ao seu grande teor de água é às suas características físico-químicas semelhantes àquelas das matrizes extracelulares nativas, especialmente no caso de hidrogéis a base de carboidratos (HOARE; KOHANE, 2008). Em virtude da sua biocompatibilidade e propriedades químicas manipuláveis (densidade de reticulação, porosidade e grau de intumescimento), hidrogéis encontram uma vasta gama de aplicações nas áreas biomédica e farmacológica (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; HOFFMAN, 2002; OH et al., 2008). Hidrogéis são particularmente atrativos para liberação controlada de fármacos. Sua estrutura altamente porosa pode ser facilmente controlada através do ajuste do grau de reticulação polimérica e da afinidade entre hidrogel e meio aquoso. A partir do controle da porosidade, obtém-se um maior domínio sobre a taxa de difusão e liberação do fármaco encapsulado na matriz polimérica do hidrogel.

No que diz respeito à aplicação de hidrogéis como sistemas carreadores de fármacos para liberação controlada, existe um grande interesse por hidrogéis estímulo-responsivos. Também conhecidos como sistemas inteligentes, estes hidrogéis são pensados para entregarem seu “conteúdo” em resposta a um estímulo externo específico que coincida com as condições fisiológicas do sítio de ação específica do fármaco (Figura 7). Dependendo da natureza do estímulo externo, hidrogéis

responsivos podem ser classificados em duas categorias: (1) responsivos a estímulos físicos (variações de temperatura, pressão, luz, campo elétrico ou magnético), e (2) responsivos a estímulos químicos (variações de pH, força iônica, composição do solvente ou presença de compostos químicos ou biológicos) (GUPTA; VERMANI; GARG, 2002; HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; KLINGER; LANDFESTER, 2012).

**Figura 7** - Esquema representativo da porosidade da rede polimérica em seu estado intumescido e desintumescido.



(Fonte: adaptado de Klinger; Landfester (2012))

Dos nanogéis carreadores de fármacos, os mais bem estudados talvez sejam aqueles responsivos à variações de temperatura e pH, com destaque para o PNIPAm (poli(*N*-isopropilacrilamida)) e copolímeros. Uma característica em comum entre os hidrogéis termossensíveis é a presença de grupamentos hidrofóbicos como, por exemplo, grupos metil, etil e propil. Hidrogéis termoresponsivos utilizam a mudança de temperatura como o gatilho que determina seu comportamento de gelificação, exibindo uma mudança de solubilidade associada a uma temperatura específica. O limiar deste processo é definido como temperatura de solução crítica inferior (LCST, lower critical solution temperature). Abaixo da LCST, as ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas e as moléculas de água são dominantes, logo, os polímeros têm sua solubilidade aumentada. Hidrogéis físicos mostram-se completamente solúveis em água abaixo da LCST. De maneira semelhante, hidrogéis químicos tendem a absorver mais água com a diminuição da temperatura. Por outro lado, ao passo que a temperatura aumenta além da LCST, as interações hidrofóbicas entre os segmentos poliméricos fortalecem-se, enquanto que as ligações de hidrogênio se tornam mais fracas. O resultado disso é o aumento da hidrofobicidade e insolubilidade do polímero. Neste caso, polímeros não reticulados covalentemente experimentam a transição sol-gel (fenômeno de transição

de solução para gel), enquanto que hidrogéis quimicamente reticulados encolhem/desintumescem. Existem, ainda, hidrogéis que são formados pelo resfriamento da solução de polímero, os quais possuem uma temperatura de solução crítica superior (UCST, upper critical solution temperature) (KLOUDA; MIKOS, 2008; QIU; PARK, 2012).

Hidrogéis preparados pela reticulação de polieletrólitos fracos geralmente exibem perfis de transição de volume associados à variação de pH. Todos os hidrogéis sensíveis ao pH contêm grupos pendentes ácidos (e.g. ácidos carboxílicos e sulfônicos) ou básicos (e.g. sais de amônia) que podem aceitar ou doar prótons em resposta a uma mudança do pH. Uma vez que o intumescimento desses hidrogéis é governada principalmente pela repulsão eletrostática entre as cargas presentes na cadeia polimérica, o grau de intumescimento é influenciado por qualquer condição que possa reduzir esta repulsão, incluindo, pH, força iônica e tipo de contraíons (KLINGER; LANDFESTER, 2012; QIU; PARK, 2012). Hidrogéis com grupamentos ionizáveis possuem uma capacidade de absorção de água muito superior àquela dos hidrogéis não-ionizáveis.

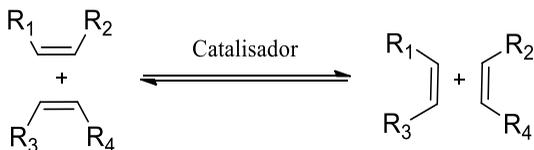
Hidrogéis responsivos ao pH têm sido bastante explorados para sistemas de liberação controlada de fármacos. As variações de pH do corpo podem ser utilizadas a favor do direcionamento de fármacos a um conjunto de células ou tecido específicos. As diferenças de pH do trato gastrointestinal (pH estômago = 1,0 – 3,0; pH duodeno = 4,8 – 8,2; pH colón = 7,0 – 7,5) também podem ser levados em consideração para administração de nanogéis carreadores de fármacos via oral, por exemplo. De maneira semelhante, o controle e acionamento da liberação dos fármacos quimioterápicos pode ser pensada para atuar em duas diferentes maneiras quando levadas em consideração as variações de pH. A liberação pode ser direcionada para o meio extra ou intracelular. No primeiro caso, tecidos tumorais tem um pH extracelular na faixa de 6,5 – 7,2, ou seja, ligeiramente menor que o pH dos tecidos normais (pH = 7,4). Após a absorção celular, os nanogéis podem experimentar um pH ainda mais baixo, o pH lisossomal (4,5 – 5,0). Este gradiente de pH é de especial importância, uma vez que variados fármacos e nanocarriadores utilizados no tratamento do câncer são internalizados por endocitose e presos dentro dos compartimentos lisossomal e endossomal (LIU et al., 2014; SCHMALJOHANN, 2006).

De uma maneira geral, qualquer fármaco hidrofílico pode ser eficientemente encapsulado em nanogéis. A encapsulação de fármacos hidrofóbicos, por outro lado, é muitas vezes limitada.

## 2.4 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO POR METÁTESE

Reações de metátese de olefinas podem ser definidas como uma transformação química na qual um par de ligações dupla carbono-carbono são rearranjadas na presença de um complexo metal-carbeno (Figura 8), resultando na formação de duas novas olefinas (BAUGHMAN; WAGENER, 2005; GRUBBS; CHANG, 1998).

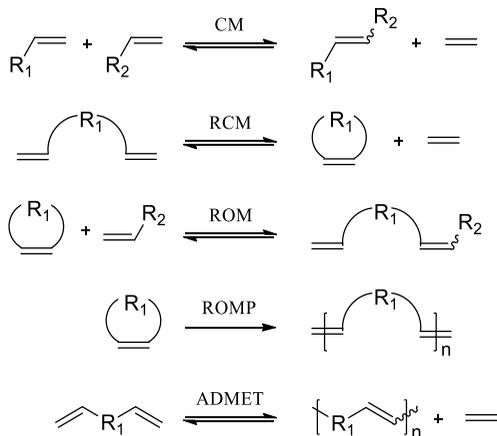
**Figura 8** - Princípio da reação de metátese de olefinas.



(Fonte: adaptado de Fürstner (2000)).

As reações de metátese de olefinas podem ocorrer via cinco diferentes rotas intimamente relacionadas (Figura 9): (1) metátese cruzada (CM, *cross-metathesis*), caracterizada pela reação entre duas olefinas distintas; (2) metátese por fechamento do anel (RCM, *ring-closing metathesis*), caracterizada pela reação intramolecular entre duas ligações duplas da mesma molécula, resultando em um alceno cíclico; (3) metátese por abertura de anel (ROM, *ring-opening metathesis*), reação inversa da RCM, é caracterizada pela formação de dienos a partir de alcenos cíclicos; (4) polimerização via metátese por abertura do anel (ROMP, *ring-opening metathesis polymerization*), caracterizada pela polimerização de alcenos cíclicos via reações de polimerização em cadeia; e (5) metátese de dieno acíclico (ADMET, *acyclic diene metathesis*), caracterizado pela polimerização de alcenos acíclicos via reações de polimerização em etapas.

**Figura 9** - Principais reações de metátese de olefinas.



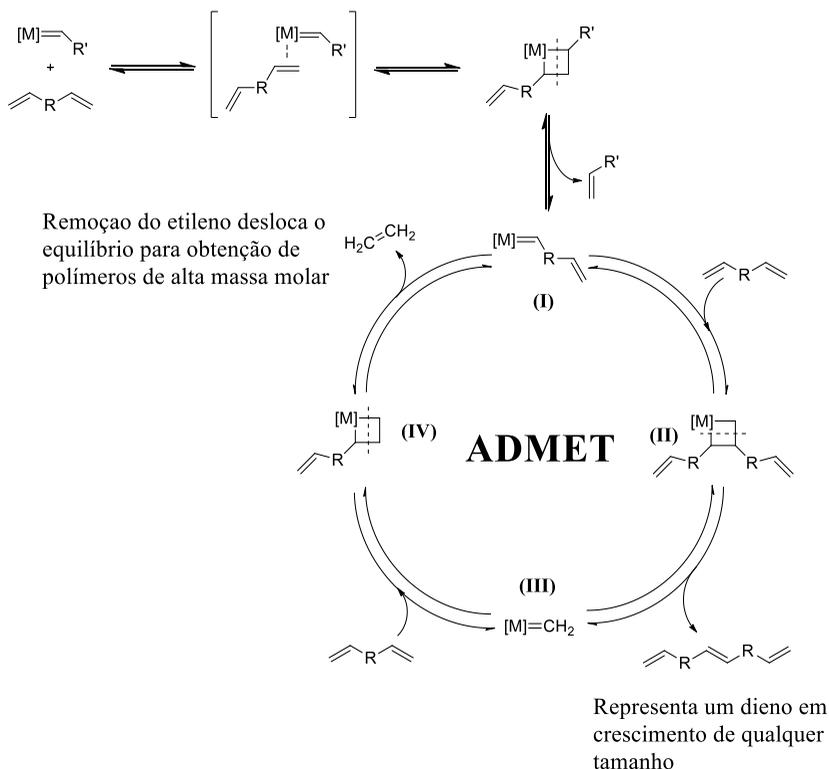
(Fonte: adaptado de Baughman; Wagener (2005)).

O mecanismo de metátese mais bem aceito (“mecanismo de Chauvin”) consiste numa sequência de cicloadições e cicloversões que envolvem a participação de alcenos, metal-carbenos e do intermediário metalociclobutano (FÜRSTNER, 2000). O ciclo catalítico envolvido no mecanismo de metátese do tipo ADMET está representado na Figura 10.

A reação ADMET inicia-se com a formação de um complexo- $\pi$  entre o catalisador e uma das olefinas do dieno, o qual sofre uma reação de cicloadição que resulta na geração de um intermediário metalociclobutano. Este processo reversível continua no sentido da polimerização quando o metalociclo decompõe-se por cicloversão formando uma nova olefina derivada do catalisador e um complexo metal-monômero, que propaga a reação (composto I do ciclo, Figura 10). A reação prossegue com a formação de outro complexo- $\pi$  com uma molécula de monômero adicional (ou uma cadeia polimérica em crescimento). O então formado complexo- $\pi$  colapsa-se em um novo intermediário metalociclobutano (composto II do ciclo). Os produtos da decomposição do metalociclo II são uma molécula do polímero em crescimento e o complexo carbeno-mitino (composto III), o verdadeiro catalisador da reação. Em uma reação de polimerização do tipo ADMET, o complexo III deve ser produzido indefinidas vezes para que um polímero de alta massa molar seja obtido. Neste estágio do ciclo reversível, um dieno adicional (ou um polímero que possui uma olefina

terminal) forma um outro intermediário metalociclobutano (composto IV), o qual, por fim, reduz-se em uma molécula de etileno e numa nova molécula do composto I, que dá continuidade ao ciclo catalítico (ATALLAH; WAGENER; SCHULZ, 2013; OPPER et al., 2011). Visto que todas as etapas individuais do ciclo catalítico são reversíveis, o etileno deve ser removido do meio reacional para que o equilíbrio seja deslocado a favor da polimerização (FÜRSTNER, 2000).

**Figura 10** - Ciclo catalítico para reações de metátese do tipo ADMET com complexo metal-carbeno.



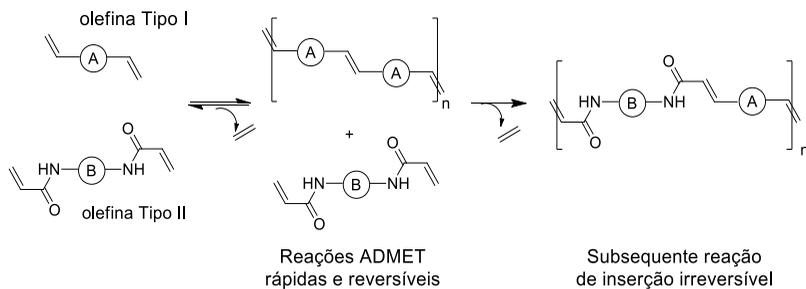
(Fonte: adaptado de Atallah; Wagener; Schulz (2013)).

A polimerização por ADMET é uma reação de policondensação de monômeros  $\alpha,\omega$ -dienos que resulta em polímeros estritamente lineares e de cadeia insaturada. Como toda polimerização em etapas, polímeros de alta massa molar só são obtidos quando um alto grau de conversão do

monômero foi alcançado. Para tanto, é necessário que o catalisador seja altamente eficaz e que permaneça ativo durante todo o ciclo de polimerização (OPPER et al., 2011). Nas reações de ADMET, praticamente todo monômero é convertido em polímero, característica em comum com a maioria das reações de policondensação. No entanto, reações colaterais de ciclização e isomerização podem ocorrer em pequenas proporções, dependendo do tipo de catalisador empregado e da temperatura reacional (BAUGHMAN; WAGENER, 2005; FOKOU; MEIER, 2010; OPPER et al., 2011).

**Reações de polimerização por ALTMET.** As reações de polimerização por ALTMET (*alternating diene metathesis*) possibilitam a síntese de copolímeros alternados via ADMET (DEMEL et al., 2003). As reações ALTMET são governadas por reações de policondensação entre olefinas ricas em elétrons (olefinas tipo I, i.e., olefinas terminais, ésteres etc.) e olefinas elétron-deficientes (olefinas tipo II, i.e., diacrilatos, diacrilamidas etc.). O mecanismo proposto para as reações ALTMET está apresentado na Figura 11.

**Figura 11** - Mecanismo de polimerização por ALTMET.



(Fonte: adaptado de Demel et al. (2003)).

As policondensações por ALTMET resultam em estruturas perfeitamente AB-alternadas devido ao uso de olefinas com diferentes reatividades. Essencialmente, a metátese entre olefinas do tipo I e II é bastante seletiva à formação de dímeros (ou copolímeros) derivados de ambos os compostos. O mecanismo das reações ALTMET envolve a (homo)polimerização de olefinas Tipo I (reações reversíveis), seguida pela incorporação gradual das olefinas tipo II na cadeia polimérica principal (reações irreversíveis). A (homo)policondensação de olefinas elétron-deficientes é suprimida por sua baixa reatividade em relação às

olefinas ricas em elétron. Além disso, o intermediário catalisador-acrilato, formado no ciclo catalítico, é inerte à propagação da reação de metátese entre olefinas elétron-deficientes. Nesse sentido, uma vez que olefinas elétron-deficiente não podem ser posicionadas ao lado uma molécula semelhante, elas são incorporadas à cadeia polimérica entre dois monômeros diferentes, criando o polímero alternado (BAUGHMAN; WAGENER, 2005; DEMEL et al., 2003).

Em uma reação ADMET típica, a remoção do sub-produto etileno favorece a reação de polimerização devido ao deslocamento do equilíbrio químico no sentido da formação dos produtos, o que evita a reação reversa de despolimerização por etenólise. No entanto, dada a natureza da irreversibilidade das reações ALTMET, copolímeros alternados são pouco suscetíveis à despolimerização induzida pela presença de etileno. Assim, condições de alto vácuo, requisito em reações ADMET típicas, tornam-se desnecessárias em reações de policondensação por ALTMET (CHATTERJEE et al., 2003; DEMEL et al., 2003; SCHULZ; WAGENER, 2012).

Na copolimerização por ALTMET de 1,9-decadieno (olefina tipo I) e 1,6-diol diacrilato (olefina tipo II), Schulz e Wagener (2012) observaram que o solvente escolhido tem papel fundamental na eficácia das reações de polimerização por metátese. O solvente utilizado nas reações pode aumentar ou mitigar os fatores que diferenciam a atividade catalítica dos catalisadores Grubbs e Hoveyda-Grubbs (FÜRSTNER, 2000) segunda geração, o que leva a resultados bastante diferentes: enquanto a taxa de ativação do catalisador é de importância primordial para o sucesso das reações de metáteses, a sua taxa de desativação desempenha papel importante na obtenção de polímeros de alta massa molar (menor desativação, maior massa molar).

Demel e colaboradores (2003) avaliaram a copolimerização por ALTMET de diferentes dienos e diacrilatos, ambos alifáticos “simples” ou com núcleo aromático. Em todas as condições avaliadas, os autores obtiveram copolímeros altamente alternados com grau de alternância-AB entre 82 e 99% e massa molar variando entre 10700 e 43700 g/mol. Na copolimerização por ALTMET de um monômero derivado da glicina (A, olefina tipo I) e diacrilato de etilenoglicol (B, olefina tipo II), Führer e Schlaad (2014) obtiveram um copolímero de massa molar  $M_n = 4800$  g/mol e grau de alternância de 85%. Para fins de comparação, a homopolimerização por ADMET de ambos os monômeros A e B resultou em polímeros com  $M_n = 2700$  g/mol e 1700 g/mol, respectivamente. Além disso, via reações ALTMET os autores conseguiram evitar as reações secundárias de isomerização observadas

durante a homopolimerização por ADMET. Devido à sua simplicidade, o método ALTMET é bastante versátil e uma alternativa às reações de policondensação convencionais

Nesta breve revisão da literatura, foram mostrados importantes resultados publicados na literatura científica relacionados diretamente com o tema desta tese de doutorado, desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para a encapsulação de fármacos. Os métodos de preparação de nanopartículas são muitos e diversos estudos foram realizados na busca por uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na preparação de nanopartículas e sua aplicação *in vivo*. Existe, contudo, um grande número de desafios a serem vencidos, e diversos aspectos da produção e aplicação das nanopartículas ainda precisam ser melhor elucidados. Assim, ainda se faz necessário uma melhor avaliação dos mecanismos de formação de partículas para encapsulação de fármacos. Justifica-se, dessa forma, o estudo da síntese de novos polímeros, especialmente aqueles biocompatíveis e biodegradáveis e com potencial aplicabilidade na área biomédica, e dos fenômenos relacionados à preparação de nanopartículas e nanocápsulas visando a encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.



## CAPÍTULO III

### **3 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO POR ALTMET DE MONÔMERO DERIVADO DA L-LISINA E A OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREADORAS DE FÁRMACOS HIDROFÓBICOS**

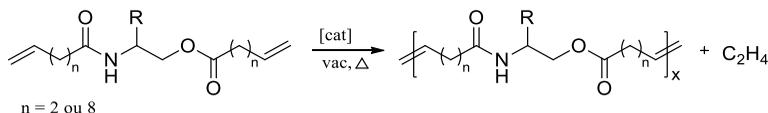
Reações de metátese olefínica vêm atraindo considerável atenção da comunidade científica como uma estratégia promissora para obtenção de novos polímeros a partir de insumos renováveis. O desenvolvimento de catalisadores bastante eficazes e altamente ativos tornou possível a inserção de praticamente qualquer grupo funcional na cadeia principal polimérica via polimerização por metátese de olefinas (ATALLAH; WAGENER; SCHULZ, 2013; FÜRSTNER, 2000; HOPKINS et al., 2001). Nesse sentido, a utilização de monômeros derivados de ácidos graxos, carboidratos e aminoácidos têm sido proposta como uma alternativa para produção de polímeros biodegradáveis a partir de matérias-primas renováveis (CARDOSO et al., 2014; FÜHRER; SCHLAAD, 2014; HOPKINS et al., 2001; ROMERA et al., 2015).

Polímeros a base de aminoácidos são candidatos em potencial para uma variedade de aplicações na área biomédica e farmacêutica em virtude da sua biocompatibilidade e degradabilidade intrínsecas. A função aminoácido pode ser incorporada tanto na cadeia principal do polímero quanto na forma de ramificações. Polímeros que exibem unidades de aminoácidos na cadeia principal são, geralmente, biodegradáveis, enquanto que aqueles em que a função aminoácido está concentrada nas ramificações tendem a ser mais hidroliticamente estáveis (HOPKINS et al., 2001). Ambas as reações de polimerização por ROMP e ADMET têm sido utilizadas na síntese de polímeros derivados de aminoácidos (FÜHRER; SCHLAAD, 2014; HOPKINS; WAGENER, 2003, 2004; HOPKINS et al., 2001; KAMMEYER et al., 2013; LEE et al., 2015; LEE; PARKER; SAMPSON, 2006; MAYNARD; OKADA; GRUBBS, 2000; SUTTHASUPA et al., 2007; TERADA et al., 2008). Contudo, reações ROMP geralmente resultam em poliolefinas com aminoácidos enxertados. Além disso, a disponibilidade de monômeros cíclicos necessários para reações ROMP é limitada (DEMEL et al., 2003). Por ADMET, por outro lado, a função aminoácido pode ser facilmente incorporadas na cadeia principal do polímero.

Apesar da alta tolerância dos catalisadores comerciais à grupos funcionais polares e próticos, catalisadores a base de rutênio mostram-se

bastante sensíveis à função amida quando próxima da olefina. Foi observado que a polimerização de monômeros derivados de aminoácidos por ADMET resulta em oligômeros ou polímeros de baixa massa molar, baixas conversões de monômero e em reações secundárias de isomerização (BAUGHMAN; WAGENER, 2005; FÜHRER; SCHLAAD, 2014; HOPKINS et al., 2001; TERADA et al., 2008). O baixo rendimento destas reações está relacionado à inativação do catalisador pela coordenação intramolecular do grupamento carbonila da função amida (proveniente do monômero derivado de aminoácidos) com o centro metálico do catalisador. Hopkins et al (2001) reportaram, no entanto, que a desativação do catalisador pode ser evitada ou menos favorecida aumentando-se o tamanho da cadeia carbônica que separa a olefina da função aminoácido do monômero (Figura 12). Quando a distância entre a olefina e a amida era de dois metilenos, os autores obtiveram polímero de massa molar  $M_n = 900$  g/mol. Quando esta distância foi aumentada para oito carbonos, foram obtidos polímeros de massa molar  $M_n > 27000$  g/mol. Führer e Schlaad (2014) observaram efeito semelhante em monômeros derivados da glicina, contudo, a extensão da cadeia carbônica não foi suficiente para impedir a isomerização das ligações duplas. Os autores somente conseguiram evitar completamente as reações de isomerização através da copolimerização dos monômeros derivados da glicina com diacrilatos via ALTMET.

**Figura 12** - Esquema da reação de polimerização de monômero derivado de aminoácidos com cadeia carbônica estendida.



(Fonte: adaptado de Hopkins et al. (2001)).

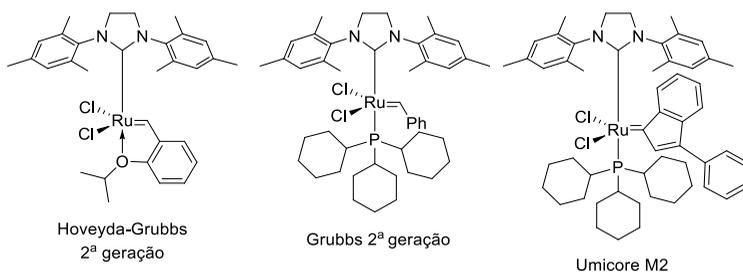
Neste capítulo é apresentado o estudo acerca da copolimerização de um monômero derivado da *L*-lisina, um amino ácido essencial, com um fosfodiéster via ALTMET. Os resultados aqui discutidos mostram que monômeros derivados de aminoácidos podem ser copolimerizados por ALTMET sem que seja necessário estender a cadeia carbônica entre a olefina e a função aminoácido do monômero. Este capítulo ainda inclui a preparação de nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenilfosfodiéster) carreadoras de rifampicina através da técnica de miniemulsão/evaporação do solvente visando a aplicação como sistemas carreadores de fármacos.

### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.1 Materiais

O monômero fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato, referido no texto como fenil-fosfodiéster, foi gentilmente cedido pelo Max Planck Institute for Polymer Research (MARSICO et al., 2012). Para a síntese do monômero *N,N'*-bis(acriloilo)-etil-éster-*L*-lisina foram utilizados: dicloridrato de *L*-lisina-etil-éster (Alfa Aesar, 99%), trietilamina (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.5\%$ ), cloreto de acrilóilo (Sigma Aldrich, 97%,  $< 210$  ppm MEHQ), diclorometano (Fisher Scientific, HPLC), acetato de etila (Sigma-Aldrich, P.A.  $\geq 99.5\%$ ), bissulfato de sódio ( $\text{NaHSO}_4$ , Acros Organics), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ , Fisher Scientific), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ , VWR Prolabo), e sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ , AppliChem). Como catalisadores (Figura 13): Hoveyda-Grubbs segunda geração (HG-2, Sigma-Aldrich), Grubbs segunda geração (G-2, Sigma Aldrich) e Umicore M2 (UM2, Umicore). Na preparação das nanopartículas: lauril sulfato de sódio (SDS, Vetec) e rifampicina (RIF, Sigma Aldrich,  $\geq 97\%$ ). O surfactante lipofílico poli[(etileno-*co*-butileno)-*b*-(óxido de etileno)] (KLE) foi sintetizado conforme metodologia descrita na literatura (SCHLAAD et al., 2001) e gentilmente cedido pelo Max Planck Institute for Polymer Research. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos. Os catalisadores foram armazenados sob atmosfera de argônio. Água destilada foi utilizada em todos os experimentos.

**Figura 13** - Catalisadores utilizados nas reações de polimerização por ALTMET.

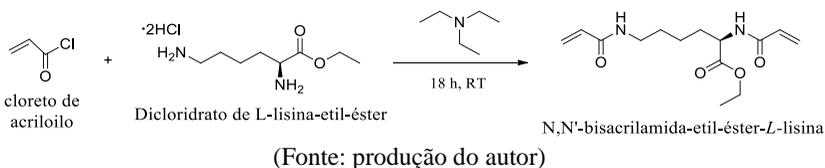


(Fonte: produção do autor)

### 3.1.2 Síntese do monômero *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina

O monômero *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina foi sintetizado via reação de Schotten-Baumann. Dicloridrato de *L*-lisina-etil-éster (5,0 g, 20,2 mmol) e trietilamina (5,0 equivalentes) foram dissolvidos em diclorometano (100 mL) e a mistura foi resfriada a 2-5 °C com auxílio de um banho de gelo. Cloreto de acrilóilo (3,0 equivalentes) foi adicionado lentamente de gota a gota ao longo de 20 min a fim de manter a temperatura abaixo de 5 °C durante todo o processo. Em seguida, o resfriamento foi interrompido e a mistura foi mantida sob agitação durante 18 h a temperatura ambiente (Figura 14). O solvente foi então removido em rotaevaporador e o produto, de cor alaranjada foi obtido, o qual foi dissolvido em acetato de etila (100 mL) e depois filtrado a fim de remover os cristais de hidrocloreto de trietilamina. A fase orgânica foi então lavada três vezes com soluções 1 M de NaHSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e NaCl. Após lavagem, a fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente removido em rotaevaporador. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (acetato de etila/hexano (1:1) e acetona/diclorometano (1:1)).

**Figura 14** - Rota de síntese do *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina.



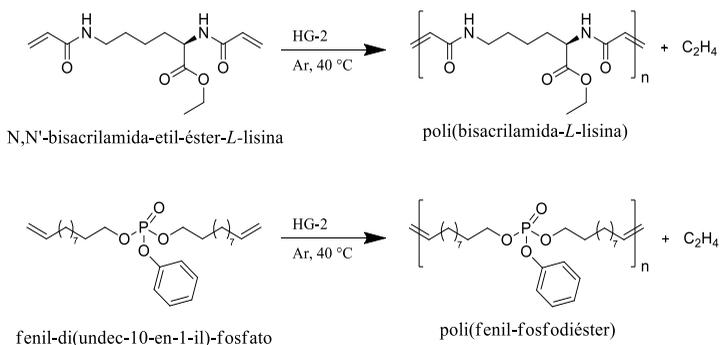
<sup>1</sup>H-RMN (850 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>, δ/ppm): 7.53 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.23 - 6.27 (m, 1H), 6.14 - 6.21 (m, 2H), 6.09 - 6.13 (m, 1H), 5.51 (dd, *J* = 10.0, 2.5 Hz, 1H), 5.46 (dd, *J* = 9.9, 2.6 Hz, 1H), 4.52 (td, *J* = 8.4, 4.9 Hz, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.15 - 3.27 (m, 2H), 1.77 - 1.85 (m, 1H), 1.63 - 1.70 (m, 1H), 1.51 (qt, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 2H), 1.38 (quin, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

### 3.1.3 Síntese de poli(bisacrilamida-*L*-lisina) e poli(fenil-fosfodiéster) via polimerização por ADMET em solução

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados o monômero *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina (40 mg, 0.140 mmol) ou fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato (67 mg, 0.140 mmol), o catalisador

Hoveyda-Grubbs segunda geração (8,0 mol% em relação ao monômero) e diclorometano (3 mL). A temperatura foi elevada para 40 °C e a reação foi mantida sob agitação e em refluxo sob atmosfera de argônio por 18 h (Figura 15). Ao final da reação, hexano gelado foi adicionado à solução a fim de promover a precipitação do polímero, o qual foi então seco sob vácuo.

**Figura 15** - Esquema da reação de polimerização do *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ADMET.



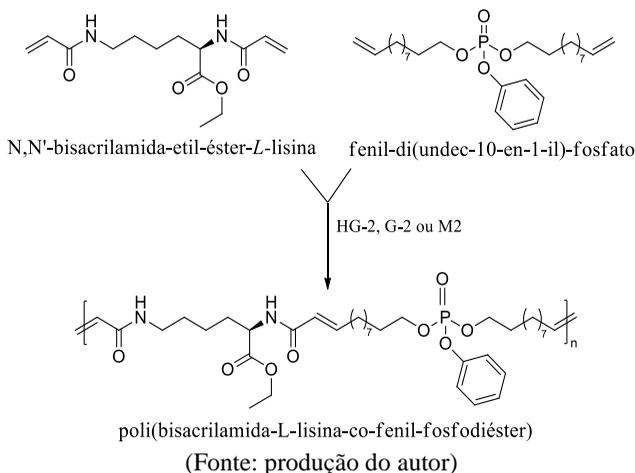
(Fonte: produção do autor)

### 3.1.4 Síntese de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) via polimerização por ALTMET em solução

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina (40 mg, 0.140 mmol), fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato (1,0 equivalente), catalisador e diclorometano ou clorofórmio (0,5 – 5,0 mL) e a mistura foi purgada com argônio. A temperatura foi elevada para 40 ou 65 °C e a reação foi mantida sob agitação e em refluxo sob atmosfera de argônio por 12 h (Figura 16). Ao final da reação, hexano gelado foi adicionado à solução a fim de promover a precipitação do polímero, o qual foi seco sob vácuo. Antes de ser utilizado para preparação das nanopartículas, o catalisador residual foi removido através do procedimento descrito por Maynard e colaboradores (2000). Resumidamente, o copolímero foi dissolvido em clorofórmio e tratado com tris(hidroximetil)fosfina e trietilamina (10 equivalentes em relação ao catalisador) sob agitação por 1 h. A mistura foi extraída com diclorometano e lavada duas vezes com solução 1 M de NaCl. A fase orgânica foi então seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente removido em

rotaevaporador. Em seguida o polímero foi dissolvido em diclorometano e precipitado com hexano gelado. O polímero foi seco em estufa de vácuo a temperatura ambiente por 48 horas. Na Tabela 1 estão apresentadas as formulações básicas utilizadas na síntese do poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) via reações ALTMET em solução.

**Figura 16** - Rota de síntese de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) por ALTMET



**Tabela 1** - Formulações das reações de copolimerização de *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(dec-10-en-1-il)-fosfato por ALTMET em solução.

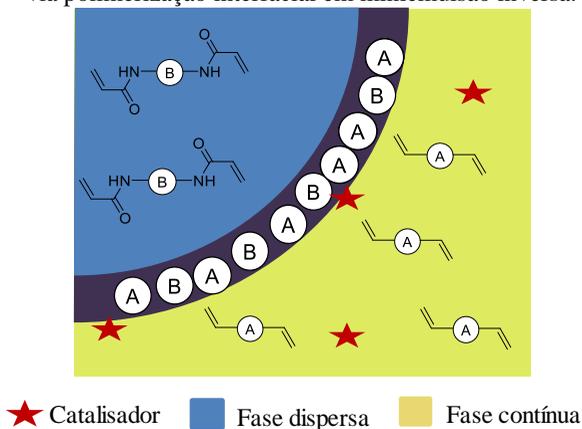
Amostra	Concentração (mol/L)	Catalisador (mol%) <sup>a</sup>	T (°C)	Solvente
C1	0,056	HG-2 (1,7%)	40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
C2	0,056	HG-2 (1,7%)	65	CHCl <sub>3</sub>
C3	0,056	HG-2 (5,0%)	65	CHCl <sub>3</sub>
C4	0,560	HG-2 (5,0%)	65	CHCl <sub>3</sub>
C5	0,056	HG-2 (8,0%)	40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
C6	0,056	G-2 (1,7%)	40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
C7	0,056	G-2 (1,7%)	65	CHCl <sub>3</sub>
C8	0,056	G-2 (8,0%)	40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
C9	0,056	UM2 (1,7%)	40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
C10	0,056	UM2 (1,7%)	65	CHCl <sub>3</sub>
C11	0,056	UM2 (5,0%)	65	CHCl <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Em relação ao monômero (mol).

### 3.1.5 Síntese de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) via polimerização por ALTMET em miniemulsão inversa

As reações por ALTMET foram também realizadas via polimerização interfacial em miniemulsão inversa (Figura 17). A fase aquosa dispersa foi preparada com a dissolução do monômero N,N'-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina (50,0 mg, 0.177 mmol) em uma mistura (300  $\mu$ L) de DMSO (ou metanol) e solução aquosa de NaCl 0,15 M. A fase dispersa foi pré-emulsificada em ciclohexano (3,60 mL) na presença do surfactante lipofílico KLE (30 mg). Após 60 min de agitação, a então preparada pré-emulsão foi sonicada (Branson Sonifier W-450-Digital, ponteira de 1/2") por 2 min com amplitude de 70 % e em um regime de pulso de 20 s de sonicacão e 10 s de pausa. Banho de gelo foi utilizado a fim de evitar o aumento da temperatura durante o processo de sonicacão. A miniemulsão resultante foi purgada com argônio e devidamente vedada com tampa de rosca com septo. Em seguida, uma solução de ciclohexano (260  $\mu$ L) contendo o monômero fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato (85 mg, 0.354 mmol) foi adicionada gota a gota à miniemulsão sob agitação branda. Por último, o catalisador (5 mol%) foi dissolvido em tolueno (0,20 mL) e imediatamente adicionado gota a gota à miniemulsão. A temperatura reacional foi elevada para 55 ou 65 °C e a reação foi mantida sob agitação por 12 h.

**Figura 17** - Representação da formação de nanocápsulas por reações ALTMET via polimerização interfacial em miniemulsão inversa.



(Fonte: produção do autor)

Na Tabela 2 estão apresentadas as formulações básicas utilizadas na síntese do poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) por reações ALTMET via polimerização interfacial em miniemulsão inversa.

**Tabela 2** - Formulações das reações de copolimerização de *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ALTMET em miniemulsão inversa.

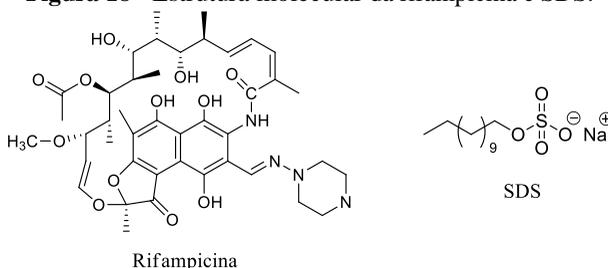
Amostra	Cat.	Monômeros (razão mol) <sup>a</sup>	Fase dispersa (razão vol.)	T (°C)
Mini1	HG-2	1:1	1:2 - DMSO:NaCl 0.15 M	65
Mini2	HG-2	1:2	1:1 - MeOH:NaCl 0.15 M	55
Mini3	HG-2	1:2	1:1 - DMSO:NaCl 0.15 M	65
Mini4	UM2	1:2	1:1 - DMSO:NaCl 0.15 M	65

<sup>a</sup> *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina : fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato

### 3.1.6 Preparação de nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) via miniemulsificação/evaporação do solvente

Nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) carreadoras de fármacos hidrofóbicos foram preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente de acordo com o procedimento descrito por Alexandrino et al. (2014) com algumas modificações. A fase orgânica dispersa, composta por uma solução de copolímero (C4, 20,0 mg), rifampicina e clorofórmio (0,56 mL), foi pré-emulsificada em uma solução aquosa contínua na presença do surfactante hidrofílico SDS (10,5 mg) sob agitação vigorosa por 60 min. Em seguida, a pré-emulsão foi sonicada (Fischer Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, ponteira de ½”) por 2 min com amplitude de 65 % e em um regime de pulso de 20 s de sonicação e 10 s de pausa. Banho de gelo foi utilizado a fim de evitar o aumento da temperatura durante o processo de sonicação. A miniemulsão foi mantida sob agitação branda a 30 °C durante 18 h para a completa remoção do solvente. Nanopartículas-branco foram preparadas sem adição de rifampicina. A Figura 18 apresenta a estrutura molecular da rifampicina e SDS.

**Figura 18 -** Estrutura molecular da rifampicina e SDS.



(Fonte: produção do autor)

### 3.1.7 Caracterização

#### 3.1.7.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massas molares médias ponderal ( $M_w$ ) e numérica ( $M_n$ ) foram determinadas por GPC em THF (vazão de 1 mL/min, 30 °C) utilizando um conjunto de colunas PSS SDV (SDV 10<sup>6</sup> A, SDV 10<sup>4</sup> A, SDV 500 A) e detectores de índice de refração (1260 RID) e UV-Vis (1260 VWD, 254 nm). A massa molar média foi determinada a partir de uma curva de calibração baseada em padrões de poli(metacrilado de metila). As análises foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

#### 3.1.7.2 <sup>1</sup>H RMN e Espectroscopia RMN Ordenada por Difusão (DOSY)

Os espectros <sup>1</sup>H-RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance 300 MHz (64 varredutas), Bruker Avance III 700 MHz (256 varreduras) ou Bruker Avance III 850 MHz (64 varreduras) a 298,3 K e utilizando THF-<sub>d8</sub> ou DMSO-<sub>d6</sub> como solvente. As análises de espectroscopia DOSY-RMN (STEJSKAL; TANNER, 1965) foram realizadas com uma sonda de gradiente-z de 5 mm TXI de tripla ressonância <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N em um sistema Bruker Avance III de 850 MHz. Para as medições de difusão, foi utilizado uma sequência 2D (DOSY, 3s data bpgp) de eco estimulado duplo (JERSCHOW; MÜLLER, 1997). A temperatura foi mantida a 298,3 K e regulada por uma amostra padrão de metanol-<sup>1</sup>H utilizando o software topspin 3.1 (Bruker). A temperatura foi controlada com uma unidade de temperatura variável (VTU, *variable temperature unit*) com uma precisão de +/- 0,1 K. O gradiente de força

foi variado em 32 pontos de 2% a 100%. O tempo de difusão foi otimizado para 80 ms e o gradiente de comprimento para 1,6 ms. O gradiente de força foi calibrado através da análise de uma amostra de  $^2\text{H}_2\text{O}/^1\text{H}_2\text{O}$  a uma temperatura definida e comparação com o coeficiente de difusão teórico de  $^2\text{H}_2\text{O}/^1\text{H}_2\text{O}$ . O atraso de relaxamento utilizado foi de 3 s. Amplitudes de gradiente de difusão foram variadas linearmente de 1 a 53 G/cm (10 a 470 mT/m) durante um total de 32 varreduras para alcançar um forte coeficiente de difusão. Os coeficientes de difusão foram calculados para as áreas dos picos integradas utilizando uma função decaimento exponencial ajustada sobre os 32 espectros. Todas as análises de  $^1\text{H}$ -RMN e DOSY-RMN foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

### 3.1.7.3 Caracterização térmica

As análises de Termogravimetria (TGA) foram realizadas em um TGA 851 (Mettler Toledo) com taxa de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  sob fluxo de nitrogênio gasoso de  $30\text{ mL}/\text{min}$  e utilizando aproximadamente  $6,5\text{ mg}$  de polímero. As amostras foram aquecidas de  $25$  a  $900\text{ }^\circ\text{C}$ .

As análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) foram realizadas em um calorímetro DSC 823 (Mettler Toledo) com uma rampa de aquecimento e resfriamento de  $-60$  a  $180\text{ }^\circ\text{C}$  a  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  sob fluxo de nitrogênio gasoso de  $30\text{ mL}/\text{min}$ . O histórico térmico de todas as amostras foi retirado. Todas as análises de TGA e DSC foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

### 3.1.7.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*)

O tamanho médio de partícula ( $D_p$ , em intensidade) e a dispersividade (PDI), que fornece informações acerca da homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partícula, foram determinados utilizando um Zetasizer Nano S ZEN1600 (Malvern Instruments) com ângulo do feixe incidente de  $173^\circ$ . As leituras foram realizadas a  $20^\circ\text{C}$  a partir de uma alíquota das dispersões sem prévia diluição. Todas as análises de DLS foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, UFSC.

### 3.1.7.5 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) da rifampicina foi determinada indiretamente através da quantificação da fração de fármaco não encapsulado livre na fase aquosa contínua. O fármaco livre foi separado da dispersão por ultrafiltração utilizando Amicon Ultra-0.5 (Millipore, 100KDa – 100.000 NMWL). A concentração de fármaco não encapsulado presente no sobrenadante foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U-1900) no comprimento de onda de 333 nm a partir de uma curva de calibração do fármaco em água com concentrações variando entre 0.7 µg/mL e 45.0 µg/mL. A eficiência de encapsulação foi determinada levando em consideração a quantidade total de fármaco adicionado na preparação das nanopartículas utilizando a seguinte equação:

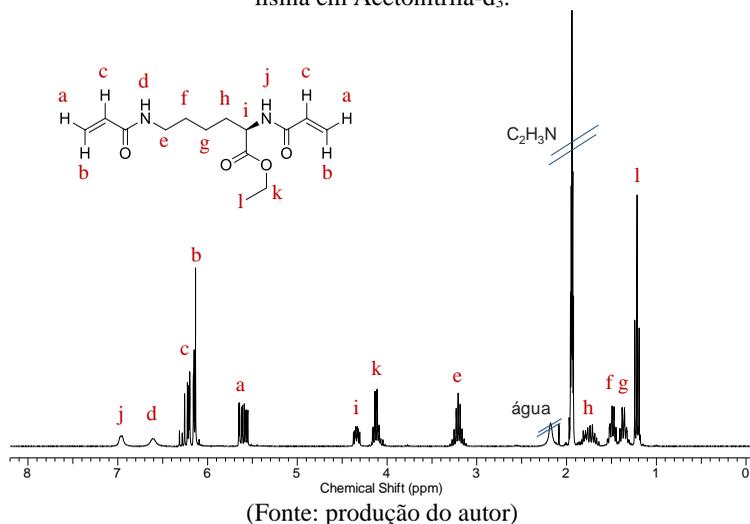
$$EE(\%) = \frac{m_{Total} - m_{Livre}}{m_{Total}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

onde,  $m_{Total}$  e  $m_{Livre}$  representam a quantidade total de fármaco adicionada e a quantidade total de fármaco livre determinada por UV-Vis, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em duplicata com pelo menos quatro medidas cada. Todas as análises de UV-Vis foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, UFSC.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi encontrado, até esta data, registro na literatura científica acerca da síntese e utilização de *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina. Neste trabalho, o monômero foi sintetizado a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Preiss et al. (2015), que sintetizaram acrilamidas derivadas de ácido glutâmico, fenilalanina e treonina, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 35% em base molar. *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina é sólido, de coloração amarelo claro, parcialmente solúvel em água e completamente solúvel em metanol, DMSO, acetonitrila e THF. A Figura 19 apresenta o espectro <sup>1</sup>H-RMN da molécula.

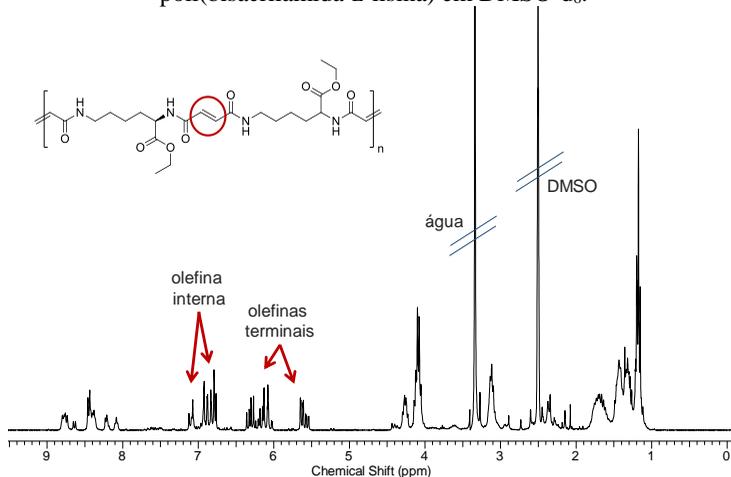
**Figura 19** - Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do  $N,N'$ -bisacrilamida-etil-éster- $L$ -lisina em Acetonitrila- $\text{d}_3$ .



### 3.2.1 Polimerização em solução

Reações de homopolimerização por ADMET de  $N,N'$ -bisacrilamida-etil-éster- $L$ -lisina, o qual não possui nenhum metileno separando a função amida da olefina terminal, foram realizadas utilizando 8,0 mol% do catalisador Hoveyda-Grubbs segunda geração. Foi observado, logo nos primeiros minutos de reação (contando a partir da adição do catalisador), uma alteração na cor da solução monomérica, que mudou de verde, cor característica do catalisador HG-2, para marrom escuro, indicando o consumo e/ou desativação do catalisador. Apesar da grande quantidade de catalisador empregada, foram obtidos apenas produtos oligoméricos de massa molar menor que 1800 g/mol (conversão do monômero não determinada). Hopkins et al. (2001) e Führer; Schlaad (2014) obtiveram resultados semelhantes na polimerização por ADMET de monômeros derivados de aminoácidos. Os autores atrelaram a inibição da polimerização à inativação do catalisador por reação de complexação intramolecular entre o centro metálico do catalisador e a carbonila da amida monomérica. A Figura 20 apresenta o espectro  $^1\text{H}$ -RMN do homopolímero poli(bisacrilamida- $L$ -lisina).

**Figura 20** - Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz) do homopolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina) em  $\text{DMSO-d}_6$ .



(Fonte: produção do autor)

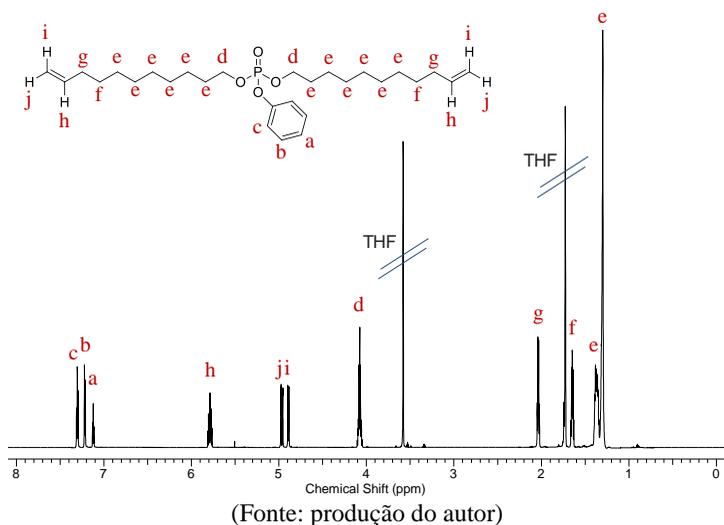
No espectro RMN da Figura 20, é possível observar os sinais das olefinas interna e externas do homopolímero, o que também indica a formação de cadeias poliméricas curtas, corroborando com os resultados obtidos por GPC.

A fim de minimizar o envenenamento do catalisador, ao invés de estender a cadeia de metileno entre a carbonila e a olefina terminal, optou-se pela copolimerização do monômero *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina (olefina tipo II) com fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato (olefina tipo I) via reações ALTMET. Segundo Chatterjee et al. (2003), reações entre olefinas terminais do tipo I e II resultam em reações de metátese cruzada bastante seletivas à formação de dímeros derivados de ambos os compostos. Nesse caso, ainda que a homodimerização da olefina tipo I (reação reversível) possa inicialmente ocorrer, a reação de metátese pode ser direcionada à formação do produto desejado através da remoção do etileno (equilíbrio é deslocado), fazendo com que o homodímero tipo I seja rapidamente consumido em uma reação secundária de metátese cruzada com a olefina tipo II (reação irreversível). A homodimerização de olefinas tipo II, nesse caso, é pouco favorecida. A Figura 21 apresenta o espectro  $^1\text{H-RMN}$  do fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato.

Estudos recentes mostram que o monômero fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato pode ser eficientemente polimerizado via reações de ADMET (MARSICO et al., 2012) e de metátese cruzada (MALZAHN et

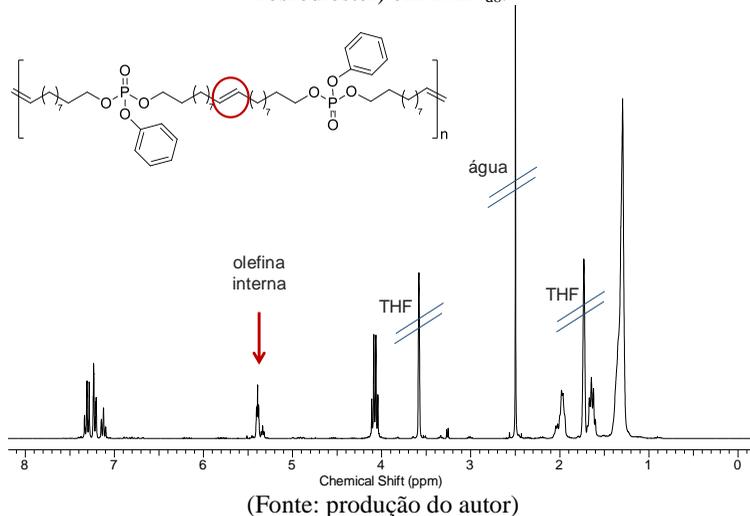
al., 2014). O polímero derivado do fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato, referido no texto como poli(fenil-fosfodiéster), pertence à classe dos polifosfodiésteres (PPE), os quais são, em sua grande maioria, biodegradáveis e quimicamente versáteis. PPEs são especialmente atraentes para aplicações biomédicas (ALEXANDRINO et al., 2014; MARSICO et al., 2012; WANG et al., 2009), uma vez que seu perfil de solubilidade, biodegradabilidade e/ou funcionalidade pode ser facilmente controlado através de ajustes químicos em sua cadeia polimérica principal, lateral ou grupos terminais.

**Figura 21** - Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (850 MHz) do fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato em  $\text{THF-d}_8$ .



O monômero fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato foi polimerizado via ADMET sob as mesmas condições reacionais aplicadas para a síntese do poli(bisacrilamida-*L*-lisina), resultando num polímero de alta massa molar ( $M_w > 20000 \text{ g/mol}$ ). A Figura 22 apresenta o espectro  $^1\text{H}$ -RMN do poli(fenil-fosfodiéster) e, ao contrário do observado para o poli(bisacrilamida-*L*-lisina), não é possível observar os sinais das olefinas terminais do polímero no espectro RMN do poli(fenil-fosfodiéster). Visto que o número de olefinas terminais é muito inferior ao das olefinas internas e dos demais prótons (cadeias poliméricas longas), os prótons das olefinas terminais não tem intensidade suficiente para aparecerem no espectro sob as condições de análise utilizadas.

**Figura 22** - Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) do homopolímero poli(fenil-fosfodiéster) em  $\text{THF-d}_8$ .



As reações de copolimerização via ALTMET dos monômeros *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato foram realizadas sob diferentes condições experimentais. Foi avaliado o efeito do tipo e concentração de catalisador (HG-2, G-2 e UM2), concentração total de monômero (0.056 M e 0.56M) e temperatura de polimerização, sobre a massa molar dos polímeros. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

As primeiras reações (C1, C6 e C9) foram conduzidas utilizando 1,7 mol% de catalisador em diclorometano a 40 °C, no entanto, apenas polímeros de baixa massa molar foram obtidos, independentemente do catalisador utilizado. As reações foram então repetidas utilizando clorofórmio à 65 °C (C2, C7 e C10), e um aumento pouco acentuado da massa molar foi observado. No que diz respeito aos catalisares Hoveyda-Grubbs segunda geração e Umicore M2, as reações de policondensação por ALTMET foram eficientes somente quando uma maior concentração de catalisador foi utilizada à 65 °C. Utilizando 5 mol% do catalisador UM2, a massa molar média do copolímero resultante (C11) aumentou para  $M_w = 18100$  g/mol, com conversão do monômero de aproximadamente 87% (determinado por gravimetria). No entanto, foi observada a formação de um precipitado insolúvel durante a reação de polimerização, o que pode indicar a formação de produtos indesejáveis por reações secundárias. Sob as mesmas condições experimentais (5,0

mol% de catalisador, 0,056 M de monômero em clorofórmio à 65 °C), o catalisador HG-2 mostrou-se menos eficiente que o UM2, resultando em polímeros (C3) de massa molar média igual a  $M_w = 11300$  g/mol e conversão de monômero próxima a 43%. Contudo, mediante o aumento da concentração de monômero (0,56 M), foram produzidos polímeros (C4) de massa molar média superior a 18000 g/mol, alcançando 90% de conversão do monômero. Apesar da elevada temperatura e concentração de monômero utilizadas, reações de isomerização não foram observadas. Todas as condições de polimerização conduziram à polímeros pouco dispersos (dispersão próxima de 2,0), indicando que o copolímero foi formado por um processo de propagação em etapas (WAGENER et al., 1990).

**Tabela 3** - Efeito do tipo e concentração de catalisador, concentração de monômero e temperatura reacional sobre a massa molar do poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) obtido via polimerização por ALTMET em solução.

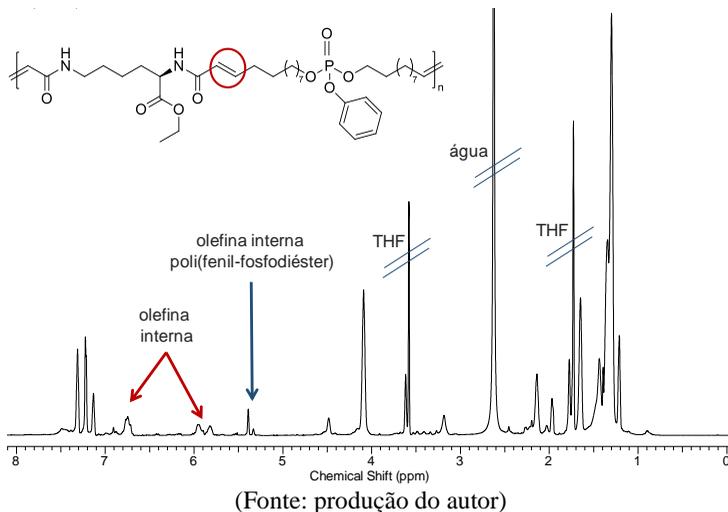
Amostra	Monômero (mol/L)	Catalisador (mol%)	T (°C)	$M_w$ (kg/mol)	$M_n$ (kg/mol)
C1	0,056	HG-2 (1,7%)	40	2,6	1,8
C2	0,056	HG-2 (1,7%)	65	4,0	2,9
C3	0,056	HG-2 (5,0%)	65	11,3	5,7
C4	0,560	HG-2 (5,0%)	65	18,5	10,6
C5	0,056	HG-2 (8,0%)	40	27,5	7,6
C6	0,056	G-2 (1,7%)	40	3,7	2,4
C7	0,056	G-2 (1,7%)	65	3,8	2,4
C8	0,056	G-2 (8,0%)	40	4,0	2,4
C9	0,056	UM2 (1,7%)	40	5,0	3,2
C10	0,056	UM2 (1,7%)	65	5,8	3,6
C11	0,056	UM2 (5,0%)	65	18,1	10,2

Um aumento adicional da concentração do catalisador HG-2 para 8.0 mol% (40 °C) resultou em polímeros (C5) com massa molar média  $M_w = 27500$  g/mol e mais dispersos ( $\mathbb{D} = 3.6$ ). O catalisador G-2 sob as mesmas condições experimentais (8,0 mol% de catalisador à 40 °C, 0.056 M de monômero) levou à formação de polímeros de baixa massa molar,  $M_w = 4000$  g/mol. Abbas; Slugovc (2011) e Schulz; Wagener (2012) observaram resultados semelhantes quando compararam a efetividade de diferentes catalisadores em reações de metátese cruzada e ALTMET, respectivamente, de olefinas tipo I e (di)acrilatos (olefina tipo II). No estudo conduzido pelos autores, em comparação ao catalisador G-2, o

catalisador HG-2 mostrou-se mais ativo e seletivo às reações de metátese entre as olefinas tipo I e II. Visto que o diclorometano utilizado nos experimentos conduzidos não é a razão da desativação do catalisador G-2, a inibição parcial da polimerização observada nas reações C6, C7 e C8 foi possivelmente causada por uma menor resistência do catalisador G-2, em comparação ao HG-2, à função amida do monômero derivado da lisina (ADJIMAN et al., 2008; SCHULZ; WAGENER, 2012).

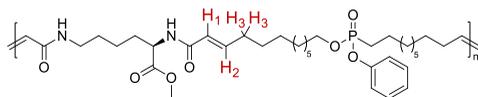
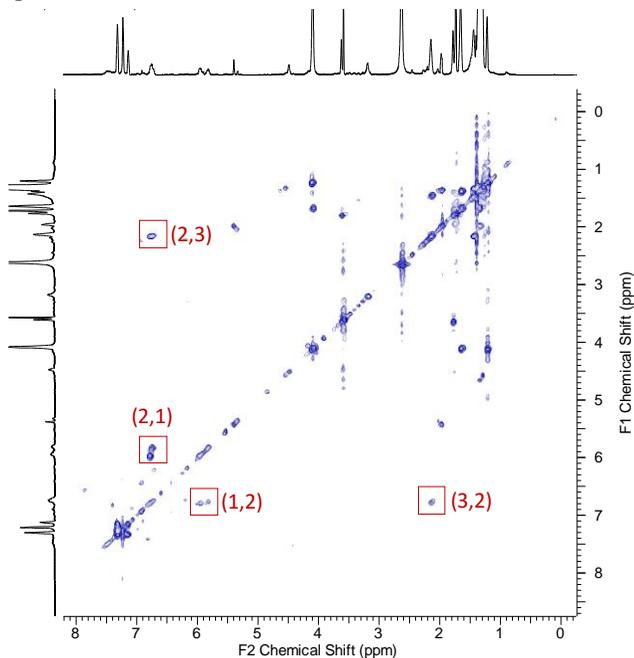
A estrutura química do copolímero formado a partir das reações ALTMET pôde ser confirmada por espectroscopia RMN ( $^1\text{H}$ -RMN (Figura 23), COSY-RMN (Figura 24),  $^{13}\text{C}$ -RMN (anexo A), NOESY-RMN (anexo A) e HSQC-RMN (anexo A)).

**Figura 23** - Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz) do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) em  $\text{THF-d}_8$ .



Através da espectroscopia 2D COSY-RMN (*homonuclear correlation spectroscopy*) é possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por  $^{2-3}J_{H,H}$  (acoplamentos geminais e vicinais, mensuráveis no espectro 1D) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (KAISER, 2000). Nos espectros  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, os picos fora da diagonal, ou picos cruzados, têm origem na interação via ligações químicas entre hidrogênios imediatamente próximos.

**Figura 24** - Espectro COSY-RMN (700 MHz) do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .



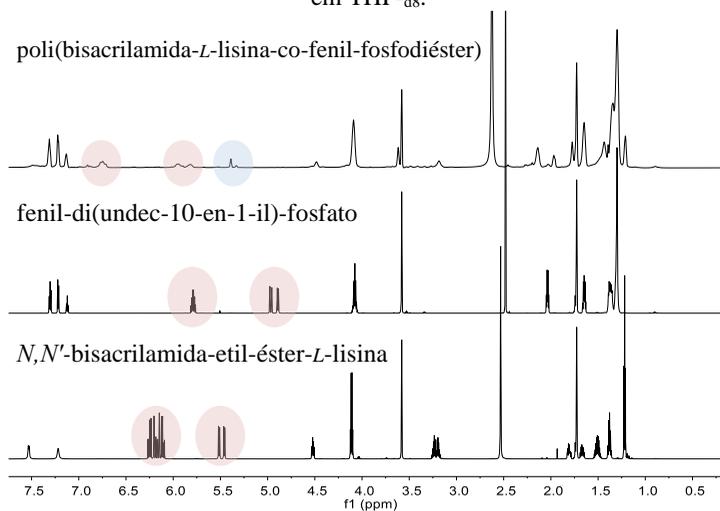
(Fonte: produção do autor)

Dessa forma, confirma-se que os sinais encontrados em 6,75 e 5,82–5,95 ppm correspondem aos hidrogênios da olefina interna do copolímero H1 e H2, já que eles apresentam interações entre si, e o H2 acopla com o sinal em 2,14 ppm (H3). Logo, o hidrogênio que tem seu sinal em 6,75 ppm corresponde ao H2, já que só este hidrogênio da olefina pode acoplar com o H3. Por consequência, o hidrogênio com sinal em 5,82–5,95 ppm corresponde ao H1.

Através da comparação dos espectros  $^1\text{H}$ -RMN de ambos os monômeros e do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) (Figura 25), fica evidente o desaparecimento das olefinas terminais do *N,N'*-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina (6,09–6,27 e 5,46–5,51 ppm) e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato (5,79–5,83 e 4,92–5,00 ppm), bem como o aparecimento das olefinas internas do copolímero

(6.75 e 5.82–5.95 ppm). Além disso, o espectro RMN ainda sugere a ocorrência de reações de dimerização do fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato, visto que o sinal da olefina interna (5.4 ppm) do poli(fenil-fosfodiéster) pode também ser observada. Por essa razão, o produto da polimerização foi também caracterizado pela técnica DOSY-RMN (Figura 24), a partir da qual é possível obter informação sobre a organização molecular do produto formado, e assim inferir se o produto obtido consiste de um copolímero AB-alternado com um certo grau de dímeros de fenil-fosfato ou uma blenda física composta pelo copolímero AB-alternado e o homopolímero poli(fenil-fosfodiéster).

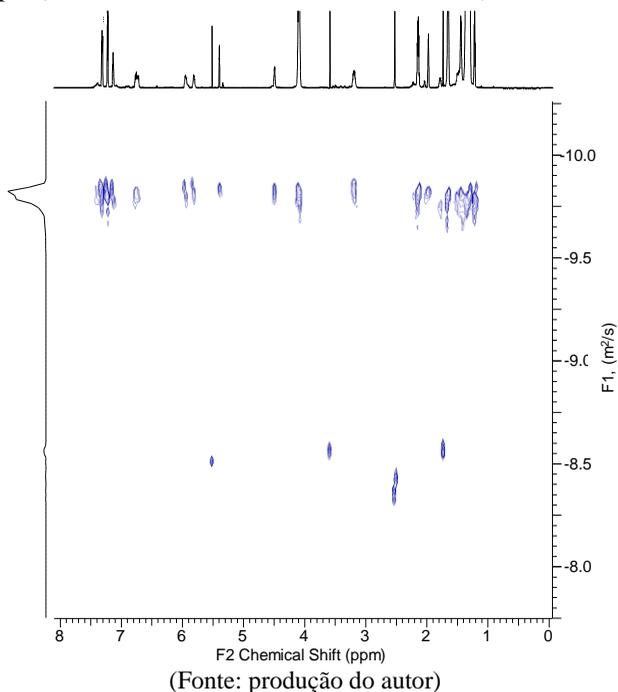
**Figura 25** - Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de ambos os monômeros (850 MHz) e do copopolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) (C3, 700 MHz) em  $\text{THF-d}_8$ .



(Fonte: produção do autor)

Através da espectroscopia DOSY-RMN é possível discriminar e caracterizar diversos componentes de uma mistura (sejam eles moléculas pequenas, macromoléculas, complexos ou agregados moleculares) a partir do seu coeficiente de difusão molecular. De uma maneira geral, a taxa de difusão de uma molécula é inversamente relacionada com sua massa molar/tamanho. Em um espectro DOSY, os deslocamentos químicos são apresentados em uma dimensão (eixo horizontal) e os coeficientes de difusão moleculares são mostrados na outra (eixo vertical) (SOUZA; LAVERDE JR., 2002).

**Figura 26** - Espectro DOSY-RMN (700 MHz) do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .

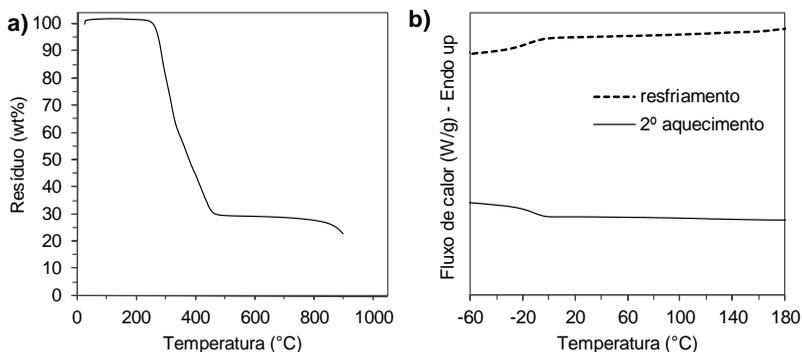


O espectro DOSY apresentado na Figura 26 é caracterizado por um único coeficiente de difusão molecular principal, evidenciando a formação do copolímero AB-alternado com um certo grau de dímeros de fenil-fosfodiéster na cadeia principal. Se o produto obtido fosse composto por uma blenda, seriam observados dois coeficientes de difusão relativos à cada um dos dois compostos.

A extensão de alternância-AB do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster), calculado por espectroscopia  $^1\text{H}$ -RMN (CHOI; RUTENBERG; GRUBBS, 2002; DEMEL et al., 2003), foi determinada como sendo superior a 80% para o polímero C3 (catalisador HG-2, 0,056M, Tabela 3), 90% para o polímero C4 (catalisador HG-2, 0,56M, Tabela 3) e 92% para o polímero C11 (catalisador UM2, 0,056M Tabela 3), confirmando a eficácia das reações de copolimerização por ALTMET. Nesse sentido, verifica-se que a arquitetura de copolímero, isto é, a extensão de alternância-AB, está intimamente relacionada com o grau de polimerização e a conversão do monômero.

Todos os polímeros obtidos, independentemente da massa molar, apresentam aspecto pegajoso à temperatura ambiente, são solúveis em THF, clorofórmio e diclorometano. Polímeros derivados de aminoácidos e poli(fosfodiésteres) podem apresentar certo grau de cristalinidade (HOPKINS; WAGENER, 2003, 2004; HOPKINS et al., 2001; MARSICO et al., 2012), com os PPEs mostrando uma baixa temperatura de transição vítrea, devido à presença dos grupos flexíveis P-O-C na cadeia polimérica principal (QIU et al., 2006). As propriedades térmicas do polímero C4 (Tabela 3) foram avaliadas por TGA e DSC (Figura 27).

**Figura 27** - Curvas de (a) TGA e (b) DSC do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) (C4, Tabela 3).



(Fonte: produção do autor)

O polímero mostrou-se estável termicamente até a temperatura de 270 °C, acima da qual iniciou-se o processo de degradação do polímero (sob atmosfera de N<sub>2</sub>). A maior perda de massa foi registrada entre 270 e 450 °C (77% de perda de peso). No ensaio de DSC, após aquecimento e resfriamento da amostra (história térmica eliminada), a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) foi observada em aproximadamente -12 °C, e nenhum evento de cristalização ou fusão foi observado, indicando que o copolímero obtido é amorfo.

### 3.2.2 Polimerização interfacial em miniemulsão inversa

No que diz respeito à preparação de nanocápsulas carreadoras de fármaco para aplicação como sistema de liberação prolongada, a polimerização em miniemulsão inversa mostra-se uma técnica de etapa única bastante conveniente, uma vez que a geração das nanocápsulas e a

encapsulação de fármacos e/ou biomoléculas hidrofílicas ocorrem simultaneamente *in situ* durante o processo de polimerização (LANDFESTER; WEISS, 2010; LUO; ZHOU, 2004). Além disso, a possibilidade de sintetizar nanocápsulas via polimerização por ALTMET na interface das nanogotas de uma miniemulsão, dá origem a uma nova classe de nanocápsulas para fins biomédicos, visto que o catalisador permanece na fase orgânica contínua e pode ser facilmente removido do sistema uma vez completa a reação de polimerização (MALZAHN et al., 2014). Nesse sentido, foram realizadas reações ALTMET para copolimerização interfacial dos monômeros N,N'-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato em miniemulsão inversa. A fim de obter um monômero completamente solúvel em água, foi realizada uma reação de desproteção para remover o grupo etil-éster do monômero N,N'-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina, contudo, o composto solúvel em água N,N'-bisacrilamida-*L*-lisina, mostrou-se extremamente instável mesmo quando armazenado a 4 °C. Dessa forma, optou-se por utilizar N,N'-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina, e uma mistura de DMSO (ou metanol) e uma solução salina de NaCl 0,3% foi utilizada para dissolver o monômero nas reações de polimerização em miniemulsão inversa (fase aquosa dispersa). Em todas as reações, o monômero fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato foi dissolvido em ciclohexano e adicionado à fase orgânica contínua. Mediada pelo catalisador, a polimerização por ALTMET ocorre apenas na interface água/óleo, formando uma casca polimérica na superfície da gota de água. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Resultados obtidos nas reações de copolimerização de N,N'-bisacrilamida-etil-éster-*L*-lisina e fenil-di(undec-10-en-1-il)-fosfato por ALTMET em miniemulsão inversa.

Amostra	Catalisador (5 mol%)	Temperatura (°C)	M <sub>w</sub> (kg/mol)	M <sub>n</sub> (kg/mol)
Mini1	HG-2	65	2,2	1,6
Mini2	HG-2	55	1,6	1,4
Mini3	HG-2	65	2,4	1,5
Mini4	UM2	65	3,0	1,8

Todas as reações de polimerização por ALTMET em miniemulsão inversa resultaram apenas em oligômeros ou polímeros de baixa massa molar, mesmo quando as condições de temperatura e concentração de catalisador utilizadas eram similares às aquelas aplicadas nas reações

ALTMET em solução. A baixa reatividade pode ser atribuída à inativação do catalisador por coordenação com DMSO ou metanol, os quais são solventes nucleofílicos. Acredita-se que a água presente na fase aquosa dispersa tenha pouca ou nenhuma influência na inativação do catalisador, dado que reações ADMET em miniemulsão (direta ou inversa) foram realizadas com sucesso anteriormente (CARDOSO et al., 2014; MALZAHN et al., 2014). O envenenamento do catalisador também pôde ser observado a olho nu, visto que a cor da mistura reacional mudou para marrom escuro em pouco menos de 10 min após a adição do catalisador. Outras formulações com diferentes concentrações de surfactante e monômero também foram avaliadas, mas nenhum resultado diferente foi observado.

Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram que não houve a formação de nanocápsulas ou nanoesferas nas reações de polimerização por ALTMET em miniemulsão inversa, possivelmente devido à baixa eficiência de polimerização dos monômeros sob as condições avaliadas.

### 3.2.3 Miniemulsificação/evaporação do solvente

Além de processos de polimerização *in situ*, nanopartículas podem ser também preparadas a partir do polímero pré-formado. A técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente foi utilizada para preparação de nanopartículas sólidas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenilfosfodiéster). Em todos os experimentos, o polímero foi sintetizado seguindo a formulação C4 (Tabela 1). Entendeu-se a formulação C4 (Tabelas 1 e 3) como aquela com melhores resultados, levando-se em consideração a quantidade de catalisador utilizada, a massa molar e a pureza do polímero obtido. Rifampicina (RIF), antibiótico de primeira escolha utilizado no tratamento da tuberculose pulmonar, foi utilizado como fármaco modelo em três diferentes concentrações, 5, 25 e 50% em massa (em relação à quantidade de polímero). As nanopartículas foram avaliadas segundo seu tamanho e eficiência de encapsulação. Nanopartículas-branco, isto é, sem RIF, foram utilizadas como controle. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Nanopartículas com diâmetro médio entre 50 e 80 nm e pouco polidispersas foram obtidas independentemente da concentração de fármaco utilizado. Uma característica importante que deve ser levada em consideração em um sistema de liberação controlada, é o teor de fármaco encapsulado e a eficiência de encapsulação. Em todas as formulações

avaliadas, foram alcançadas eficiências de encapsulação superiores a 94%.

**Tabela 5** - Tamanho médio ( $D_p$ ), distribuição do tamanho (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) de nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (médias  $\pm$  desvio padrão,  $n = 2$ )

Amostra	RIF (m%)	$D_p \pm DP$ (nm)	$PDI \pm DP$	EE (%)	Teor RIF ( $mg_{rif}/g_{pol}$ )
S1	0	$52,5 \pm 9,8$	$0,180 \pm 0,008$	—	—
S2	5	$76,0 \pm 21,6$	$0,217 \pm 0,087$	$96,3 \pm 1,0$	$48,2 \pm 0,5$
S3	25	$52,9 \pm 4,8$	$0,203 \pm 0,044$	$94,3 \pm 0,5$	$235,8 \pm 1,25$
S4	50	$75,5 \pm 24,7$	$0,103 \pm 0,032$	$95,8 \pm 2,6$	$479,0 \pm 13,0$

A encapsulação de rifampicina em nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) pode ser comparada com outros sistemas de micro- nanopartículas. Singh e colaboradores (2013), por exemplo, reportaram a preparação de nanopartículas lipídicas sólidas carreadoras de rifampicina através de uma adaptação da técnica de microemulsão, obtendo 65% de eficiência de encapsulação. Pandey e Khuller (2005) alcançaram 51% de eficiência na encapsulação de rifampicina em micropartículas de ácido esteárico preparadas via emulsificação/evaporação do solvente. Sharma e colaboradores (2004) encapsularam rifampicina em nanopartículas de PLGA funcionalizada com lecitina, também pelo método de emulsificação/evaporação do solvente, alcançando 54% de eficiência de encapsulação. A maior eficiência de encapsulação alcançada em nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster), em relação aos sistemas acima mencionados, pode ser atribuída à formação de possíveis ligações de hidrogênio entre a hidroxila e o grupamento amina da rifampicina com os grupamentos amida e carbonila do copolímero. É importante também salientar que, mesmo sendo um fármaco de caráter hidrofóbico, a rifampicina apresenta solubilidade em água de até 2,5 mg/mL (SIGMA-ALDRICH; 2016). A concentração total de rifampicina utilizada em todos os experimentos é inferior à concentração máxima de solubilidade do fármaco em água.

### 3.3 CONCLUSÕES

Neste capítulo, um monômero derivado de L-lisina (N,N'-bisacrilamida-etil-éster-L-lisina) foi sintetizado e copolimerizado com fenil-fosfodiéster dieno via reações ALTMET utilizando os catalisadores Hoveyda-Grubbs segunda geração, Grubbs segunda geração e Umicore M2. Enquanto a tentativa de homopolimerização do monômero N,N'-bisacrilamida-etil-éster-L-lisina via ADMET tenha resultado em polímero de baixa massa molar ( $< 1800$  g/mol) devido à desativação do catalisador por reações de coordenação, poli(bisacrilamida-L-lisina-co-fenil-fosfodiéster) de massa molar variando entre 2600 e 18000 g/mol pôde ser sintetizado por reações de copolimerização por ALTMET. Foi observado que a concentração de monômero e catalisador, bem como a temperatura reacional, exerceram grande influência sobre a conversão do monômero, massa molar e arquitetura do polímero. Todas as formulações resultaram em polímeros alternados-AB com um certo grau de dímeros de fenil-fosfodiéster na cadeia principal. O grau de alternância-AB dos copolímeros de alta massa molar ( $M_w > 18000$  g/mol) foi determinado em aproximadamente 90%. Adicionalmente, nanopartículas de poli(bisacrilamida-L-lisina-co-fenil-fosfodiéster) carreadoras de rifampicina, com diâmetro médio de 50 – 80 nm, foram preparadas via miniemulsão/evaporação do solvente. Para todos os casos avaliados, foram obtidas eficiências de encapsulação superiores a 94% e teores de fármaco variando entre 45 e 480 mg<sub>rif</sub>/g<sub>pol</sub>.



## CAPÍTULO IV

### 4 SÍNTESE DE NANOGÉIS DERIVADOS DE ÁCIDO GLUTÂMICO CARREADORES DE FÁRMACOS HIDROFÍLICOS VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA

Considerável atenção tem sido dirigida para o desenvolvimento de materiais inteligentes que respondem a estímulos físicos e químicos. Polímeros que apresentam esta habilidade, tais como os hidrogéis, exibem propriedades adequadas para uma variedade de aplicações como, por exemplo, sistemas de liberação controlada de fármacos, análises de separação, sistemas óticos e cristais coloidais (KLINGER; LANDFESTER, 2011; KURATA; DOBASHI, 2004; PREISS et al., 2015). A combinação da estrutura hidrofílica tridimensional polimérica dos hidrogéis com a natureza coloidal de partículas na escala nanométrica, resulta em propriedades ainda mais atraentes para aplicações biomédicas.

Uma classe bastante interessante de nanogéis estímulo-responsivos para aplicação como sistemas de liberação controlada baseia-se na alteração das propriedades físico-químicas de sua rede polimérica mediante a aplicação de um sinal externo. Em comparação aos hidrogéis macroscópicos, nanogéis apresentam uma capacidade de resposta muito mais rápida, permitindo assim um melhor controle (temporal e/ou espacial) sobre a liberação do fármaco (QIAO et al., 2011). Este efeito é mais facilmente percebido em nanogéis sensíveis a alterações de pH e temperatura, e pode ser aplicado em benefício de um melhor controle sobre a difusão do composto encapsulado utilizando-se de diferentes mecanismos: (1) o intumescimento e desintumescimento permite o ajuste do tamanho da malha de poros em relação ao raio hidrodinâmico do ativo encapsulado; (2) a ionização/desionização da rede polimérica polieletrólita permite o ajuste das interações eletrostáticas entre o encapsulado e a matriz polimérica; e (3) incorporação de compostos hidrofóbicos – excluindo assim a água do interior do hidrogel – previne a difusão prematura do encapsulado (hidrofílico) antes da liberação desencadeada pela indução do intumescimento (KLINGER; LANDFESTER, 2011; SANKARANARAYANAN et al., 2010).

Neste capítulo é apresentado o estudo acerca da síntese de hidrogéis e nanogéis derivados de ácido glutâmico, um aminoácido não essencial, via reações de polimerização em solução e miniemulsão inversa visando à encapsulação de fármacos hidrofílicos para liberação sustentada. A

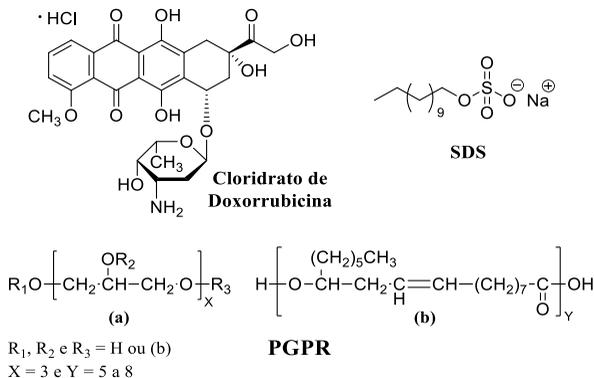
literatura acerca dos hidrogéis derivados de ácido glutâmico é bastante vaga, tendo sido a síntese e as propriedades dessa classe de hidrogéis pouco estudadas. Hidrogéis à base de aminoácidos são especialmente atrativos para aplicação nas áreas biomédica e farmacêutica visto que sua biocompatibilidade e degradabilidade intrínsecas são combinadas com as propriedades únicas dos nanogéis. Não há registro na literatura, até essa data, sobre a preparação de nanogéis de poli(acrilamida ácido glutâmico). Os resultados aqui discutidos mostram que a formação de hidrogéis fisicamente reticulados está intimamente relacionada com a concentração de monômero utilizada e que o grau de intumescimento dos hidrogéis física e quimicamente reticulados é pH-dependente. Os testes de encapsulação e de citotoxicidade revelam que os nanogéis derivados de ácido glutâmico apresentam biocompatibilidade e potencial aplicabilidade como sistemas carreadores de fármacos hidrofílicos.

## 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.1 Materiais

Para a síntese do monômero foram utilizados: *L*-ácido glutâmico (Sigma-Aldrich, 99%), hidróxido de sódio (NaOH, Sigma-Aldrich), cloreto de acrilóilo (Sigma Aldrich, 97%, < 210 ppm MEHQ), cloreto de sódio (NaCl, VWR Prolabo), ácido clorídrico (HCl, Sigma-Aldrich, 37%), acetato de etila (Fischer Scientific, p.a.) e sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>, AppliChem). Para a síntese das nanopartículas foram utilizados: ciclohexano (VWR Prolabo, HPLC), persulfato de potássio (KPS, Acros Organics), azobisisobutironitrila (AIBN, Fluka, p.a. ≥ 98 %), *N,N'*-metilenobis(acrilamida) (BIS, Sigma-Aldrich, 99 %), poliglicerol poliricinoleato (PGPR, Danisco), lauril sulfato de sódio (SDS, Alfa Aesar, 99 %) e cloridrato de doxorubicina (DOXO, Sigma-Aldrich) (Figura 28). Todos os reagentes foram utilizados como recebidos. Água destilada foi utilizada em todos os experimentos.

**Figura 28** - Estrutura molecular do cloridrato de doxorubicina e dos surfactantes utilizados.

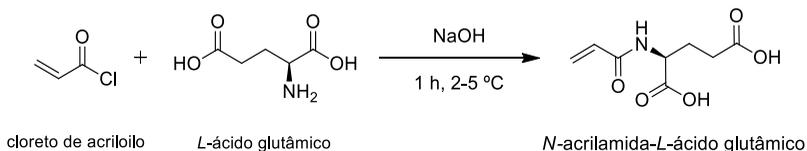


(Fonte: produção do autor)

#### 4.1.2 Síntese do monômero *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico (*L*-AGA)

O monômero *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico foi sintetizado via reação de Schotten-Baumann (Figura 29). *L*-ácido glutâmico (14,7 g, 0,1 mol) foi dissolvido em uma solução aquosa de NaOH gelada (3,0 equivalentes, 35 mL H<sub>2</sub>O) e a mistura foi resfriada à 2-5 °C com auxílio de um banho de gelo. Cloreto de acrilóilo (1,0 equivalentes) foi adicionado lentamente, de gota a gota, ao longo de 60 min enquanto mantida a temperatura abaixo de 5 °C durante todo o processo. Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação durante 1 h e, então, aquecida naturalmente até temperatura ambiente. A solução foi acidificada para pH = 2 através da adição de HCl, supersaturada com NaCl a temperatura ambiente e extraída quatro vezes com acetato de etila quente (400 mL, 50 – 60 °C). A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente removido em rotaevaporador. O produto obtido foi utilizado sem purificação adicional. Rendimento: 70 mol%.

**Figura 29** - Rota de síntese do *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico.



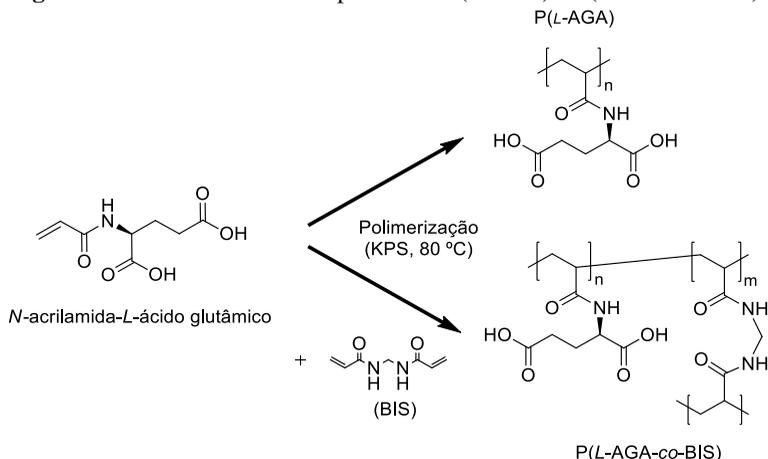
(Fonte: produção do autor)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ /ppm): 12.44 (s, 2H), 8.38 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 6.38 – 6.16 (m, 1H), 6.16 – 6.00 (m, 1H), 5.62 (dd,  $J=10.1, 2.3$  Hz, 1H), 4.28 (ddd,  $J=9.1, 7.7, 5.1$  Hz, 1H), 2.40 – 2.16 (m, 2H), 2.08 – 1.87 (m, 1H), 1.89 – 1.69 (m, 1H).

### 4.1.3 Síntese do poli(*L*-AGA) e poli(*L*-AGA-*co*-BIS) via polimerização em solução

O hidrogel fisicamente reticulado poli(acrilamida-*L*-ácido glutâmico) (P(*L*-AGA)) foi sintetizado via polimerização por radicais livres em solução (Figura 30). O monômero *L*-AGA (100 mg) e o iniciador KPS (2 ou 5 m% em relação ao monômero) foram dissolvidos em uma solução aquosa de NaCl 0,15 M a uma concentração de até 50% em massa (Tabela 6). A reação de polimerização foi conduzida em ampolas de vidro devidamente vedadas, a 80 °C durante 4 h. Uma vez completa a reação, 10 mL de água destilada foram adicionados e a amostra foi deixada em repouso por 48 h. Em seguida, a amostra foi filtrada a fim de remover o monômero não reagido e as cadeias poliméricas solúveis (não reticuladas), e ambos produto e filtrado foram liofilizados. O teor de gel foi assim determinado para todas as amostras por gravimetria. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

**Figura 30** - Rota de síntese dos polímeros P(*L*-AGA) e P(*L*-AGA-*co*-BIS).



(Fonte: produção do autor)

O hidrogel quimicamente reticulado poli(acrilamida- *L*-ácido

glutâmico-*co*- metilenobisacrilamida) (P(*L*-AGA-*co*-BIS)) foi sintetizado via polimerização por radicais livres em solução (Figura 30). O monômero *L*-AGA (100 mg), o reticulante BIS (2, 5 ou 20 m% em relação ao monômero) e o iniciador KPS (5 m% em relação ao monômero) foram dissolvidos em uma solução aquosa de NaCl 0,15 M a uma concentração de 40% em massa (Tabela 6). As reações de copolimerização foram conduzidas conforme procedimento descrito para a síntese de P(*L*-AGA).

**Tabela 6** - Formulações adotadas para síntese dos polímeros P(*L*-AGA) e P(*L*-AGA-*co*-BIS) via polimerização em solução a 80 °C.

Amostra	Conc. Monômero (m%) <sup>a</sup>	KPS (m%) <sup>b</sup>	BIS (m%) <sup>b</sup>	Rede Polimérica
B1-B6	< 20	2 ou 5	--	--
B7	30	5	--	Hidrogel físico
B8	40	2	--	Hidrogel físico
B9	40	5	--	Hidrogel físico
B10	40	5	2	Hidrogel químico
B11	40	5	5	Hidrogel químico
B12	40	5	20	Hidrogel químico
B13	50	5	--	Hidrogel físico

<sup>a</sup> em relação à solução aquosa de NaCl 0,15M, base mássica.

<sup>b</sup> em relação ao monômero, base mássica.

#### 4.1.4 Síntese dos nanogéis de P(*L*-AGA) e P(*L*-AGA-*co*-BIS) via polimerização em miniemulsão inversa

Nanogéis química e fisicamente reticulados foram sintetizados via polimerização por radicais livres em miniemulsão inversa. Para a preparação da fase aquosa dispersa o monômero *L*-AGA e o reticulante BIS (quando usado) foram dissolvidos em uma solução aquosa de NaCl 0,15 M (350 µL). A fase orgânica contínua foi preparada pela solubilização de PGPR (0,175 g) em ciclohexano (3,5 g). As fases contínua e dispersa foram misturadas e, após 60 min de agitação, a então preparada pré-emulsão foi sonicada (Branson Sonifier W-450-Digital, ponteira de ½") por 2 min com amplitude de 70 % e em um regime de pulso de 20 s de sonicação e 10 s de pausa. Banho de gelo foi utilizado a fim de evitar o aumento da temperatura durante o processo de sonicação. A reação de polimerização foi conduzida a 80 °C por 4 h. Para reações de polimerização iniciadas a partir da fase aquosa. KPS foi adicionado à

solução salina logo após a completa solubilização do monômero. No contrário, para reações iniciadas a partir da fase orgânica, AIBN foi adicionado à miniemulsão imediatamente após o processo de sonicção. Independentemente do tipo, 5% de iniciador, em base mássica, foram utilizadas em todos os experimentos. Quando utilizado, o fármaco cloridrato de doxorubicina foi dissolvido na fase aquosa dispersa. As quantidades de iniciador e reticulante utilizados em cada reação estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Formulações adotadas para a síntese de nanogéis de P(L-AGA) and P(L-AGA-co-BIS) via polimerização em miniemulsão inversa.

Amostra	Conc. Monômero (m%) <sup>a</sup>	BIS (m%) <sup>b</sup>	Iniciador (5 m%) <sup>b</sup>	T (°C)
M1	30	--	KPS	80
M2	40	--	KPS	80
M3	40	--	AIBN	70
M4	40	2	KPS	80
M5	40	2	AIBN	70
M6	40	5	KPS	80
M7	40	5	AIBN	70
M8	50	--	KPS	80

<sup>a</sup> em relação à solução aquosa de NaCl 0,15M, base mássica.

<sup>b</sup> em relação ao monômero, base mássica.

Uma vez completa a reação de polimerização, as dispersões foram resfriadas naturalmente até temperatura ambiente e lavadas por centrifugação ( $6721 \times g$  durante 20 min à 15 °C, 3-30K Sigma Centrifuge) três vezes com ciclohexano a fim de remover o surfactante em excesso. Em seguida, os nanogéis foram transferidos para uma fase aquosa através da adição de 0,5 mL da dispersão em 1,5 mL de uma solução aquosa contendo 0,3 m% de SDS. As amostras foram mantidas sob agitação durante 18 h à temperatura ambiente para completa evaporação do ciclohexano. Soluções translúcidas foram obtidas em todos os experimentos. Para remover o monômero não reagido, os oligômeros solúveis (não reticulados) e o SDS em excesso, as amostras foram submetidas a duas etapas adicionais de lavagem com água por ultrafiltração utilizando Amicon Ultra-2 (Millipore, MWCO 100 kDa;  $6721 \times g$  durante 30 min à 15 °C).

#### 4.1.5 Ensaios de viabilidade celular dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS)

A linhagem celular HeLa e L929 (carcinoma uterino humano) utilizada nos experimentos foi adquirida no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio MEM (meio mínimo essencial de Eagle) (HeLa) e DMEM (MEM modificado por Dulbecco) (L929) acrescido de soro fetal bovino 7,5 m%, bicarbonato de sódio 8 mmol/L, tampão HEPES ((*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico)) 20 mmol/L e gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada de 95%. Os repiques foram realizados utilizando-se solução de tripsina em intervalos pré-determinados. As células foram colhidas assepticamente, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços com aproximadamente 10<sup>5</sup> células por poço. Após a aderência (24 h), uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi retirada, e as nanopartículas foram adicionadas em diferentes concentrações (25 – 200 µg/mL). Após adição das nanopartículas, o volume final foi completado para 200 µL com meio MEM completo. Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas 3x com solução tampão. Após este período, foi realizada a viabilidade celular pelo teste do MTT. O MTT é um ensaio colorimétrico cujo componente principal é o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium (MTT). O MTT é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis formando cristais de formazan de cor púrpura. A absorção do formazan dissolvido na região do visível correlaciona-se com o número de células viáveis. Assim, alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente, na absorbância, o que permite quantificar a citotoxicidade do tratamento de maneira indireta. Os compostos citotóxicos são capazes de danificar ou destruir as células, resultando, conseqüentemente, numa diminuição do processo de redução do MTT e, logo, da produção de formazan. Para os testes MTT, 200 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados à solução de células, seguindo-se de incubação por 3 h (37 °C/5% CO<sub>2</sub>). Após as 3 h de incubação, o MTT não reagido foi removido, e 200µL de DMSO foram adicionados para solubilizar o formazan formado. Os resultados foram obtidos em leitor de microplacas utilizando-se um filtro de 550 nm contra um branco de DMSO. Todos os ensaios de viabilidade celular foram realizados em colaboração com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin Rocha.

#### 4.1.6 Ensaios de hemólise

Para analisar o efeito de hemólise dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) em glóbulos vermelhos normais (RBC, *red blood cells*), cinco amostras de sangue humano foram coletadas de acordo com as exigências de comitê de ética (CEPSH n° 913/2010). Para os ensaios de hemólise, 4 mL de sangue total, recém coletado, foram adicionados a 8 mL de uma solução estéril de cloreto de sódio em água (solução salina). A mistura foi então centrifugada a  $10000 \times g$  durante 5 min para isolar os glóbulos vermelhos, os quais foram lavados cinco vezes com solução salina e, em seguida, diluídos em 2 mL de solução salina (suspensão diluída de hemácias). As nanopartículas foram incubadas, em triplicata, na suspensão diluída de hemácias a uma concentração de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  sob agitação branda durante 60 min a  $37^\circ\text{C}$ . A suspensão foi, então, centrifugada a  $10000 \times g$  durante 5 min e 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços. O conteúdo de hemoglobina liberada devido à ação hemolítica das nanopartículas foi determinado no sobrenadante por meio da absorbância em 540 nm. A hemólise observada na ausência de nanopartículas foi utilizada como controle. 120  $\mu\text{L}$  da suspensão diluída de hemácias foram incubados com 880  $\mu\text{L}$  de água ou solução salina e utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. A hemólise percentual foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{controle negativo}}{\text{controle positivo} - \text{controle negativo}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

Todos os ensaios de viabilidade celular foram realizados em colaboração com o Departamento de Análises Clínicas, UFSC, sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Claudia dos Santos Silva.

#### 4.1.7 Caracterização

##### 4.1.7.1 Espectroscopia $^1\text{H-RMN}$

Os espectros  $^1\text{H-RMN}$  foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance 300 MHz (64 varreduras), Bruker a 298,3 K e utilizando DMSO- $d_6$  como solvente. As análises foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

#### 4.1.7.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massas molares médias ponderal ( $M_w$ ) e numérica ( $M_n$ ) foram determinadas por GPC em uma solução aquosa de  $\text{NaNO}_3$  0,1 M (vazão de 1 mL/min, 60 °C) utilizando um conjunto de colunas PSS SUPREMA (Suprema Linear XL e Suprema Linear M) e detectores de índice de refração (Shodec RI 101) e UV-Vis (Dual 2487, 270 nm). A massa molar média foi determinada a partir de uma curva de calibração baseada em padrões de poli(acrilato de sódio). As análises foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

#### 4.1.7.3 Ensaios de intumescimento e dependência de pH dos hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS)

Os testes de intumescimento foram realizados a temperatura ambiente para determinação do grau de intumescimento dos hidrogéis. Aproximadamente 100 mg de amostras liofilizadas de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (polímeros B7 – B13, Tabela 6) foram submersas em 20 mL de água destilada e após 6 h, as amostras foram filtradas, secas superficialmente com auxílio de papel filtro a fim de remover o excesso de água superficial e, então, pesadas novamente.

Para determinar a influência do pH sobre o grau de intumescimento de P(L-AGA) (amostra B9, Tabela 6) e P(L-AGA-co-BIS) (amostra B11, Tabela 6), amostras secas e previamente pesadas foram submersas em água destilada e o pH de cada amostra foi ajustado entre 2 e 10 através da adição de uma solução aquosa de HCl e NaOH. O pH foi medido a cada hora e ajustado sempre que necessário ao longo de 6 h. O grau de intumescimento dos hidrogéis em tampão fosfato pH = 7 foi também avaliado. O grau de intumescimento foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Grau de intumescimento} \left( \frac{g_{H_2O}}{g_{Pol}} \right) = \frac{m_i - m_s}{m_i} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $m_i$  e  $m_s$  representam a massa do polímero intumescido e seco, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.1.7.4 Caracterização térmica

As análises de Termogravimetria (TGA) foram realizadas em um

TGA 851 (Mettler Toledo) com taxa de aquecimento de 10 °C/min sob fluxo de nitrogênio gasoso de 30 mL/min e utilizando aproximadamente 5,0 mg de polímero. As amostras foram aquecidas de 25 a 1000 °C.

As análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) foram realizadas em um calorímetro DSC 823 (Mettler Toledo) com uma rampa de aquecimento e resfriamento de -40 a 200 °C a 10 °C/min sob fluxo de nitrogênio gasoso de 30 mL/min, utilizando aproximadamente 10,0 mg de polímero. O histórico térmico de todas as amostras foi retirado. Todas as análises de TGA e DSC foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

#### 4.1.7.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*)

O tamanho médio em intensidade ( $D_p$ ) e a dispersão das partículas foram determinados utilizando um Nicomp 380 submicron particle sizer (Nicomp Particle Sizing Systems, USA) com ângulo do feixe incidente de 90°. As leituras foram realizadas a 23°C a partir de alíquotas das dispersões diluídas em ciclohexano. A dispersão das partículas (desvio padrão) foi determinada como a largura à meia altura do ajuste Gaussiano da distribuição de tamanho de partícula e está representada como barra de erros nos respectivos diagramas. As análises de DLS multi-ângulo (30 – 150°) foram realizadas em um espectrômetro ALV consistindo de um goniômetro compacto ALV/CGS3 com laser de He/Ne (632,8 nm) e um correlator múltiplo-tau digital ALV/LSE-5004. As análises foram realizadas utilizando amostras diluídas com água destilada e previamente filtradas com um filtro hidrofílico 0,45 µm. As análises foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha. O tamanho médio de partícula ( $D_p$ , em intensidade) e a dispersividade (PDI) dos nanogéis carreadores de DOXO foram determinados utilizando um Zetasizer Nano S ZEN1600 (Malvern Instruments) com ângulo do feixe incidente de 173°. As leituras foram realizadas a 20°C a partir de uma alíquota das miniemulsões diluídas em ciclohexano. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, UFSC.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz baseia-se na medida das flutuações dependentes do tempo e da intensidade da luz espalhada pelas partículas que estão em constante movimento Browniano (aleatório) para determinar o diâmetro médio de partícula. O equipamento utiliza-se do movimento das partículas para determinar o coeficiente de difusão

translacional ( $D_T$ ), o qual é então correlacionado ao raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) da partícula a partir da equação de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_T} \quad (\text{Eq. 4})$$

sendo  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura e  $\eta$  a viscosidade do solvente. A relação entre raio hidrodinâmico e o ângulo de espalhamento de luz (luz espalhada pela partícula) é dada pelas seguintes equações

$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{Eq. 6})$$

onde  $\Gamma$  representa a taxa de relaxação da função de correlação temporal (é obtida a partir da autocorrelação das flutuações de intensidade da luz espalhada com o tempo),  $q$  a magnitude do vetor de espalhamento,  $n_0$  o índice de refração do meio contínuo,  $\lambda_0$  o comprimento de onda da luz incidente e  $\theta$  o ângulo de espalhamento (PECORA, 2000).

#### 4.1.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas poliméricas de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) foi avaliada via MEV em um microscópio LEO Gemini 1530 Zeiss. As amostras para análise foram diluídas com ciclohexano até teor de sólidos de 0,1% e uma gota (10  $\mu\text{L}$ ) foi colocada sobre placas de sílica. As placas foram, então, secas em temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram analisadas sob tensão de 0.12 kV. Todas as análises foram realizadas no Max Planck Institute for Polymer Research, Alemanha.

#### 4.1.7.7 Eficiência de encapsulação

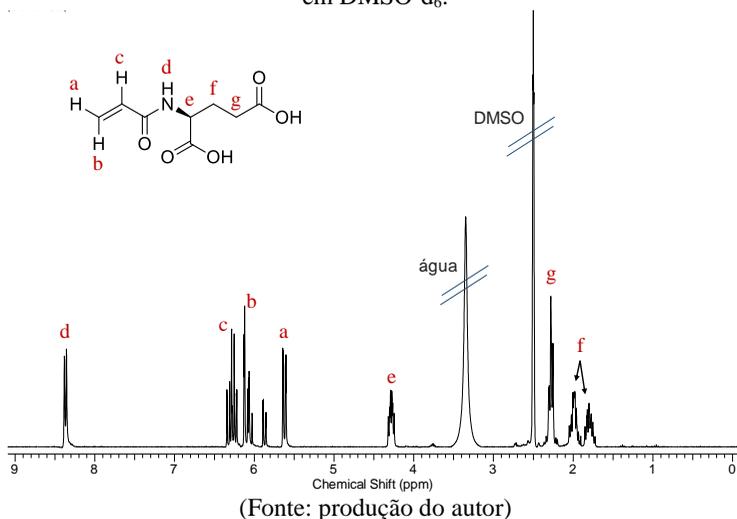
A eficiência de encapsulação (EE) do cloridrato de doxorrubicina foi determinada conforme procedimento descrito anteriormente no item 3.1.7.5. A concentração de fármaco não encapsulado presente no sobrenadante foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U-1900) no comprimento de onda de 480 nm a partir de uma

curva de calibração do fármaco em água com concentrações variando entre 0,5 µg/mL e 50,0 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Todas as análises de UV-Vis foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, UFSC.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monômero *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico foi sintetizado a partir da metodologia descrita por Wu et al. (2003). P(*L*-AGA) é um sólido gelatinoso, de coloração variando entre branco e translúcido, solúvel em água, metanol e DMSO. A Figura 31 apresenta o espectro <sup>1</sup>H-RMN da molécula.

**Figura 31** - Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) do *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico em DMSO-d<sub>6</sub>.



### 4.2.1 Polimerização em solução

Reações de polimerização do P(*L*-AGA) foram realizadas em solução com uma concentração de monômero variando entre 13 e 50% em base mássica em relação à quantidade de água utilizada (solvente). Logo na primeira hora de reação, foi observado um aumento acentuado da viscosidade do meio reacional nos experimentos conduzidos com concentração de monômero superior a 30%. Nos experimentos realizados

com menos de 20% de monômero, por outro lado, um aumento da viscosidade bem menos pronunciado foi observado. Todas as formulações avaliadas com 20% ou menos de monômero resultaram em polímeros completamente solúveis em água. A Tabela 8 apresenta a massa molar dos polímeros solúveis.

**Tabela 8** - Massa molar média do poly(L-AGA) preparadas via polimerização em solução (amostras completamente solúveis em água).

Amostra	Monômero (m%) <sup>a</sup>	KPS (m%) <sup>b</sup>	M <sub>w</sub> (kg/mol)	M <sub>n</sub> (kg/mol)
B1	13	2	178	55
B2	13	5	146	47
B3	16	2	198	62
B4	16	5	155	49
B5	20	2	195	69
B6	20	5	183	56

<sup>a</sup> em relação à solução aquosa de NaCl 0,15M, base mássica.

<sup>b</sup> em relação ao monômero, base mássica.

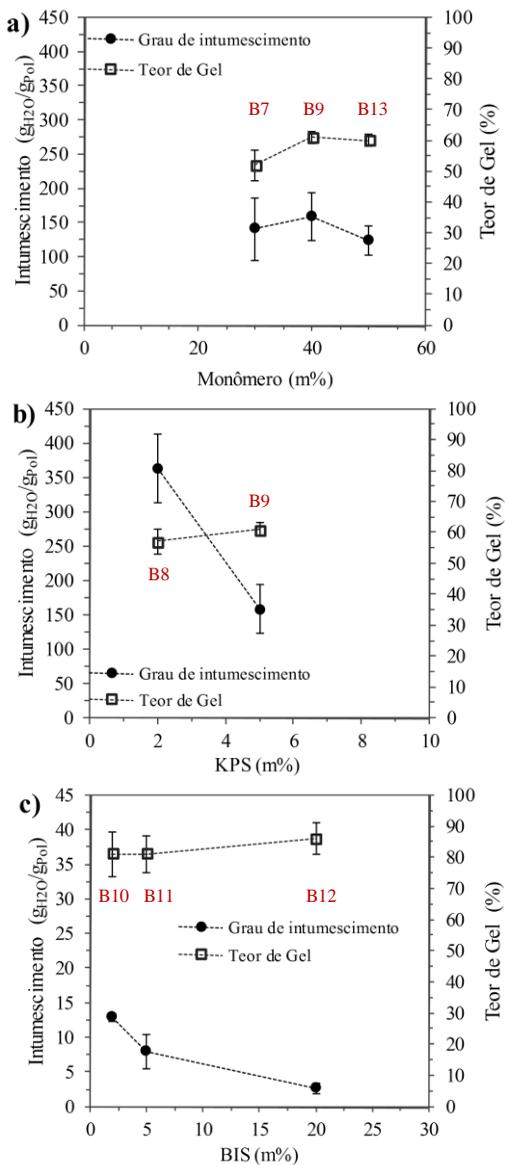
Todos os polímeros preparados com 13, 16 e 20% de monômero apresentaram elevada massa molar, entre M<sub>w</sub> = 146000 a 198000 g/mol. Como era esperado, o aumento da quantidade de iniciador de 2 para 5% exerceu efeito inverso sobre a massa molar dos polímeros. Em média, polímeros com massa molar 15% menores foram obtidos quando 5% de KPS foi utilizado. É possível também observar uma tendência ao aumento da massa molar com o aumento da concentração de monômero. Nas reações com 5% de iniciador, por exemplo, mediante o aumento da quantidade de monômero utilizada de 13 para 20%, um aumento de mais de 20% na massa molar foi registrado. Este comportamento está, possivelmente, relacionado com a maior proximidade das cadeias poliméricas decorrente da maior concentração de monômero utilizada, o que favorece a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, e que resulta, conseqüentemente, no aumento da viscosidade reacional. Este aumento da viscosidade desencadeia a ocorrência de um efeito gel mais pronunciado, que se traduz no aumento da massa molar final.

Este mesmo fenômeno justifica a formação de hidrogéis fisicamente reticulados nas reações conduzidas com 30% ou mais de monômero. Reações de polimerização com 30, 40 e 50% de monômero foram realizadas na ausência de agente e reticulante e, em todos os casos avaliados, foram obtidas estruturas poliméricas reticuladas por ligações

de hidrogênio insolúveis em água ou outros solventes orgânicos polares (e apolares). Xie et al. (2006) também observaram a formação de hidrogéis de P(*L*-AGA) a partir de reações de polimerização via radicais livres. Contudo, como os autores apenas tinham interesse por polímeros completamente solúveis, a homopolimerização do *L*-AGA não foi explorada. Curiosamente, os autores observam que a homopolimerização do *N*-metacrilamida-*L*-ácido glutâmico resulta em polímeros completamente solúveis em água. De maneira semelhante, outros polímeros derivados de ácido glutâmico, tais como poli( $\alpha$ -ácido glutâmico), poli( $\gamma$ -ácido glutâmico) e poli(*N*-acrilamida-*tert*-butil-*L*-ácido glutâmico), também são solúveis em água (BAJAJ; SINGHAL, 2011; LI, 2002; PREISS et al., 2015). Hidrogéis de poli( $\gamma$ -ácido glutâmico) podem ser obtidos, todavia, através de reações de esterificação a partir do polímero pré-formado e de agentes reticulantes (GONZALES; FAN; SEVOIAN, 1996).

O efeito da concentração de monômero e de iniciador nas propriedades dos hidrogéis de P(*L*-AGA) foi avaliado segundo o grau de intumescimento em água e o teor de gel, que representa o grau de conversão de monômero em hidrogel (visto que nem toda cadeia polimérica formada está reticulada). Para fins de comparação, hidrogéis quimicamente reticulados também foram preparados através da adição do agente reticulante BIS nas concentrações de 2, 5 e 20% em relação à quantidade de monômero. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 32.

**Figura 32** - Grau de intumescimento ( $g_{H_2O}/g_P$ ) e teor de gel (%) do P(L-AGA) preparado com diferentes quantidades de (a) monômero e (b) iniciador; (c) P(L-AGA-co-BIS) preparado com diferentes quantidades de BIS (barras de erro representam desvio padrão, n = 3, B7 - B13, Tabela 6).

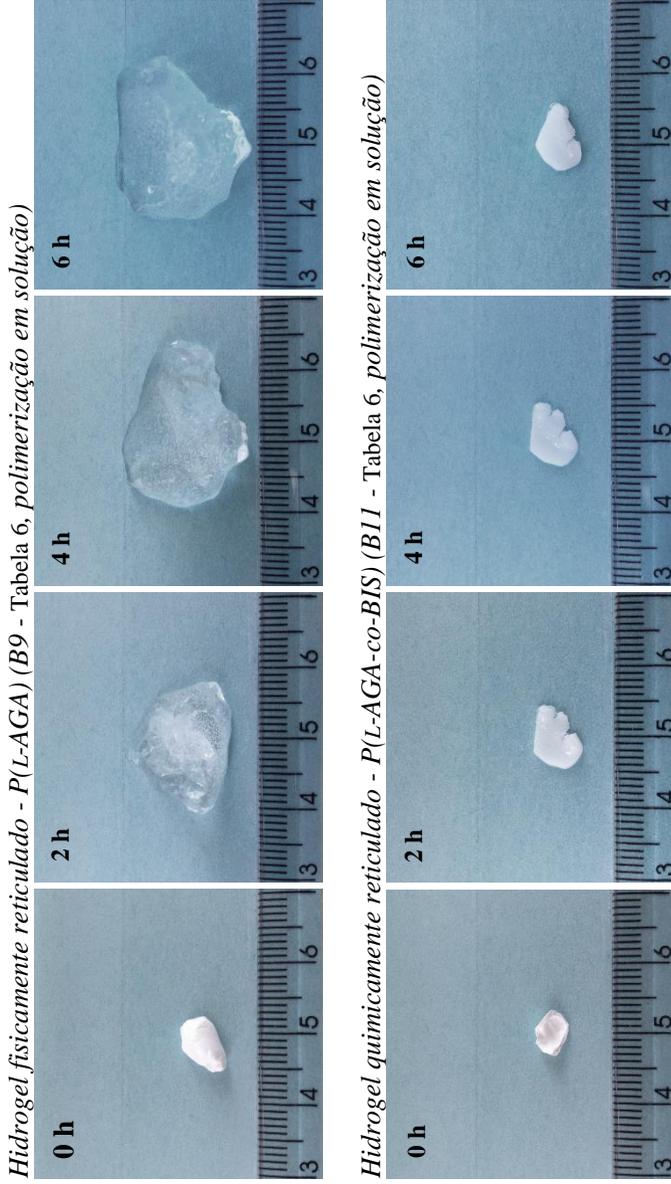


(Fonte: produção do autor)

Não foi observada diferença marcante entre as reações de polimerização com 30, 40 ou 50% de monômero (B7, B9 e B13, respectivamente, Tabela 6) (Figura 32a). Nos três casos, foram alcançados teores de gel bastante similares, sendo ligeiramente menor,  $52 \pm 5$ , a nos experimentos com 30% de monômero, contra  $61 \pm 2$  e  $60 \pm 2$ , respectivamente para 40 e 50%. A adição do agente reticulante BIS resultou em reações de reticulação mais eficientes, e hidrogéis com teores de sol/gel de aproximadamente 85% foram obtidos (Figura 32c). Por outro lado, a adição de BIS restringiu fortemente a capacidade de absorção de água dos hidrogéis. O intumescimento dos hidrogéis com 2, 5 e 20% (B10, B11 e B12, respectivamente, Tabela 6) ficou limitado a aproximadamente 13, 8 e 2,5  $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{Pol}}$ , respectivamente, enquanto que aproximadamente 140, 158 e 123 g de água foram absorvidos por grama de hidrogel fisicamente reticulado (respectivamente para os hidrogéis B7, B9 e B13). Os hidrogéis de P(L-AGA-co-BIS) são caracterizados por suas ligações intermoleculares de natureza covalente (reticulação química), as quais são mais fortes e menos flexíveis que as ligações de hidrogênio que conectam as cadeias poliméricas dos hidrogéis físicos de P(L-AGA). Enquanto as ligações de reticulação físicas podem ser mais facilmente rompidas pela água, as ligações covalentes permanecem rígidas e o intumescimento dos hidrogéis químicos fica limitado à capacidade de expansão da estrutura tridimensional polimérica, o que justifica o menor grau de intumescimento dos hidrogéis de P(L-AGA-co-BIS), bem como a diminuição da capacidade de absorção de água com o aumento da quantidade de BIS utilizada. A Figura 33 apresenta a evolução do intumescimento dos hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (B9 e B11, respectivamente, Tabela 6) em água ao longo de 6 h.

A concentração de iniciador, KPS, (Figura 32b) também não afetou de maneira significativa o teor de gel dos hidrogéis de P(L-AGA), contudo, os hidrogéis preparados com 2% de KPS apresentaram uma capacidade de absorção de água bastante superior àqueles preparados com 5% de KPS (362  $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{Pol}}$  e 158  $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{Pol}}$ , respectivamente). Acredita-se que este comportamento esteja relacionado com a densidade de reticulação dos hidrogéis físicos, visto que é esperado que os hidrogéis preparados com 5% de KPS apresentem maior densidade (maior força elástica e resistência ao intumescimento). Ainda que seja de grande interesse, a quantificação da densidade de reticulação dos hidrogéis não pôde ser calculada dada à grande variedade de componentes solúveis (monômero, oligômeros e NaCl).

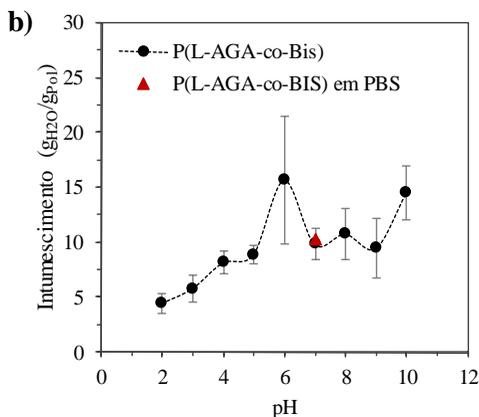
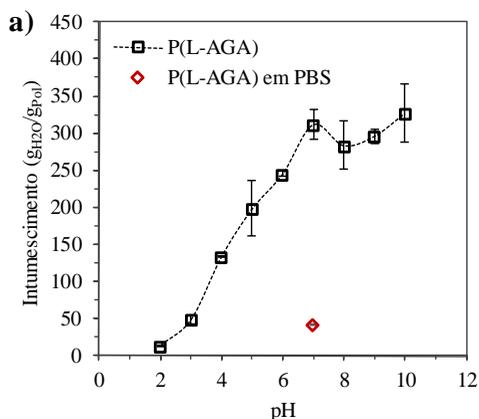
**Figura 33** - Fotografia dos hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) no teste de intumescimento em água ao longo de 6 h.



(Fonte: produção do autor)

Os hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) foram projetados para exibir um perfil de intumescimento dependente do pH. Essencialmente, a protonação e desprotonação dos grupos ácido carboxílico e amida atuam diretamente sobre a hidrofiliicidade do polímero e, conseqüentemente, sobre o grau de intumescimento dos hidrogéis. Para avaliar este comportamento, hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (B9 e B11, respectivamente, Tabela 6) foram submetidos à ensaios de intumescimento sob diferentes condições de pH. Os resultados estão apresentados na Figura 34.

**Figura 34** - Efeito do pH sobre o grau de intumescimento ( $\frac{g_{H_2O}}{g_{Pol}}$ ) de hidrogéis de (a) P(L-AGA) (B9, Tabela 6) e (b) P(L-AGA-co-BIS) (B11, Tabela 6) (barra de erros representam desvio padrão,  $n = 3$ ).



(Fonte: produção do autor)

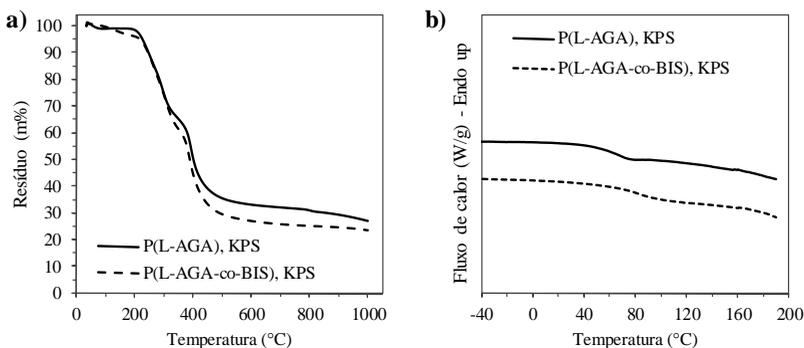
Como esperado, os hidrogéis mostraram-se sensíveis a alterações de pH. Para ambos os hidrogéis física e quimicamente reticulados, foi possível observar um aumento do grau de intumescimento com o aumento do pH. Este comportamento é mais acentuado para os hidrogéis de P(L-AGA), nos quais as cadeias poliméricas estão conectadas, principalmente, por ligações de hidrogênio, as quais são fortemente influenciadas pelas reações de protonação e desprotonação. O aumento do pH resultou na desprotonação dos grupos ácidos e básicos da cadeia polimérica e no consequente enfraquecimento das ligações de hidrogênio, contribuindo para o aumento da hidrofiliabilidade do polímero. Esse efeito é também influenciado pelas forças eletrostáticas de repulsão entre os íons formados na cadeia polimérica mediante a variação de pH e as reações de desprotonação. Isto fica mais evidente quando o grau de intumescimento dos hidrogéis de P(L-AGA) em tampão fosfato (PBS) pH = 7 é comparado com aquele em água no mesmo pH. Quando intumescidos em PBS, os hidrogéis apresentaram um grau de intumescimento quase 7,5 vezes menor que o observado em água a pH = 7 (ajustado pela adição de NaOH), o que sugere que os íons presentes na solução tampão atuam na blindagem dos grupos iônicos da rede polimérica. Como resultado, observa-se uma diminuição da repulsão eletrostática e, conseqüentemente, da capacidade de absorção de água (KLINGER; LANDFESTER, 2011). Nos hidrogéis de P(L-AGA-co-BIS) este mesmo efeito não é observado, indicando que o intumescimento é fortemente limitado pelas ligações covalentes de reticulação (as quais entram a expansão da rede polimérica), sendo assim menos influenciado pelas reações de protonação e desprotonação.

As amostras de hidrogéis em diferentes pHs foram aquecidas a 80 °C e mantidas nesta temperatura durante 7 dias sob agitação branda em um shaker. Foi observado que após 5 dias, amostras de P(L-AGA) em pH > 7 dissolveram-se completamente. Durante as condições avaliadas de temperatura e tempo, não foi observada a completa dissolução das amostras de P(L-AGA) em pH < 7, e no final de 7 dias ainda era possível observar macroestruturas de hidrogel dispersas em água. Nenhuma diferença foi observada nos hidrogéis de P(L-AGA-co-BIS).

Todos os polímeros obtidos, independentemente da massa molar, são sólidos e de coloração branca opaca à temperatura ambiente. As propriedades térmicas dos hidrogéis B9 e B11 (Tabela 6) foram avaliadas por TGA e DSC (Figura 35). Ambos os polímeros P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) apresentaram um perfil de decomposição térmica bastante semelhantes. Os hidrogéis mostraram-se estáveis termicamente até a temperatura de aproximadamente 200 °C (Figura 35a), acima da qual iniciou-se o processo de decomposição do polímero (sob atmosfera de

N<sub>2</sub>). A perda de massa dos polímeros ocorre em dois estágios principais. A primeira região de decomposição com perda de massa (200 – 300 °C) está relacionada, principalmente, à decomposição do grupamento ácido carboxílico do polímero derivado de ácido glutâmico, enquanto o segundo estágio (>300 °C) está associado à decomposição da cadeia polimérica principal (KUMAR et al., 2009). Até a temperatura de 600 °C, uma perda de massa de aproximadamente 70 e 74% foi registrada para os hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS), respectivamente. As análises de DSC (Figura 35b) indicam que ambos os polímeros são completamente amorfos. Após aquecimento e resfriamento da amostra (história térmica eliminada), a temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) observada foi de aproximadamente 62 e 78 °C, respectivamente para o P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS), e nenhum evento de cristalização ou fusão foi observado.

**Figura 35:** Curvas de (a) TGA e (b) DSC dos hidrogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (B9 e B11, Tabela 6).

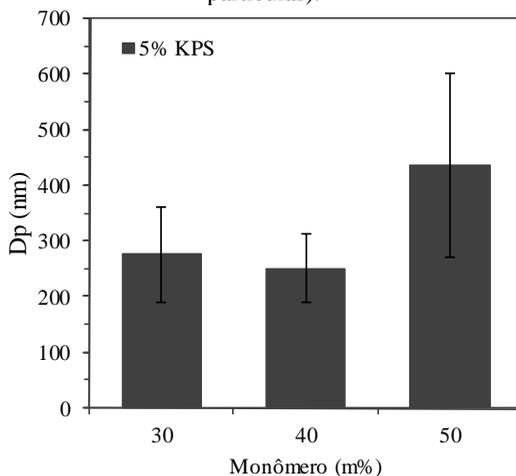


(Fonte: produção do autor)

#### 4.2.2 Polimerização em miniemulsão inversa

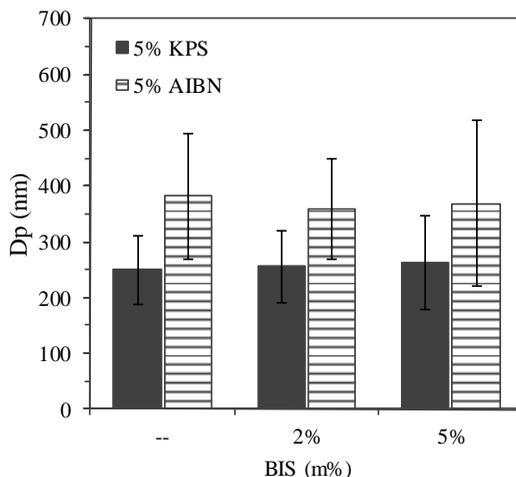
Reações de polimerização em miniemulsão inversa foram conduzidas a fim de preparar nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) visando a encapsulação de fármacos hidrofílicos para liberação sustentada. As polimerizações foram conduzidas sob diferentes condições experimentais para avaliar o efeito da concentração de monômero e agente reticulante, e tipo de iniciador empregado sobre o tamanho médio e a dispersão das partículas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 36 e Figura 37.

**Figura 36** - Efeito da concentração de monômero sobre  $D_p$  das nanopartículas de P(L-AGA) em ciclohexano (barra de erros representa a dispersão das partículas).



(Fonte: produção do autor)

**Figura 37**: Efeito do tipo de iniciador (KPS e AIBN) e concentração de reticulante (BIS) sobre  $D_p$  das nanopartículas de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) em ciclohexano (barra de erros representa a dispersão das partículas).



(Fonte: produção do autor)

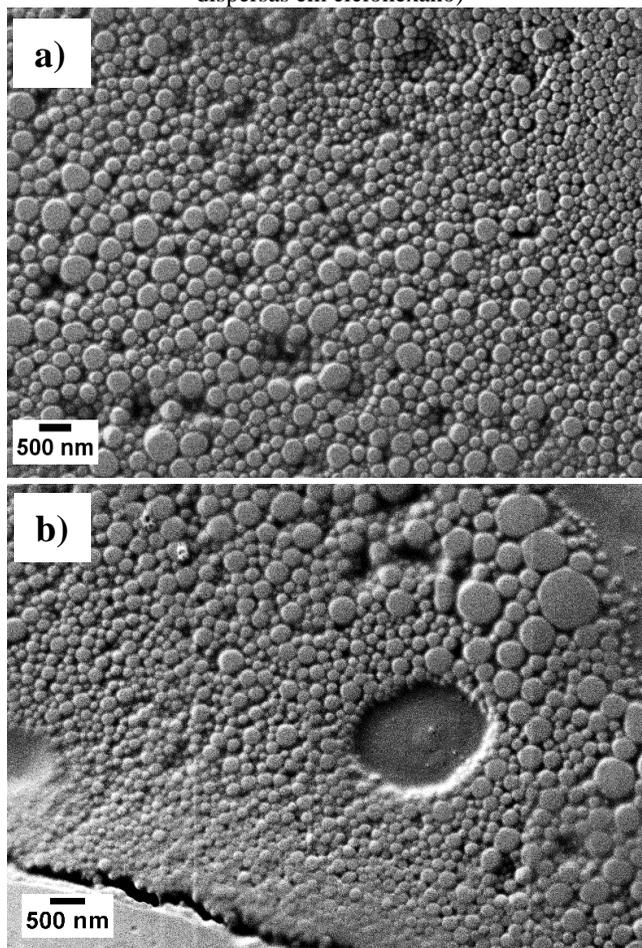
Todos os sistemas avaliados resultaram em miniemulsões estáveis com partículas na escala nanométrica, com tamanho variando entre 250 e

440 nm. Nanogéis de P(L-AGA) fisicamente reticulados foram eficientemente obtidos com concentrações de 30, 40 e 50% de monômero (em relação à fase aquosa dispersa). O aumento do tamanho de partícula mediante o aumento da concentração de monômero/polímero é recorrentemente relatado na literatura, e está associado, na maioria dos casos, à processos de emulsificação menos eficientes devido ao aumento da viscosidade da fase dispersa (KWON et al., 2001; MAINARDES; EVANGELISTA, 2005; PERES et al., 2015; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1996). Variações na quantidade de monômero de 30 para 40% resultaram em nanogéis com aproximadamente o mesmo diâmetro médio e dispersividade. No entanto, quando a concentração de monômero foi elevada para 50%, foram obtidos nanogéis quase duas vezes maiores e mais polidispersos em comparação com aqueles preparados com 30 ou 40% de monômero. A adição do agente reticulante também não influenciou de maneira significativa o tamanho de partícula, tendo sido obtidos nanogéis com diâmetro médio de aproximadamente 255 nm para todas as miniemulsões preparadas com KPS e 370 nm para aquelas com AIBN. Curiosamente, as miniemulsões preparadas com AIBN resultaram em nanopartículas maiores que aquelas com KPS, quando o oposto seria esperado. Sendo o AIBN solúvel na fase orgânica contínua, a formação dos radicais e o início da reação de polimerização começam na fase contínua. Quando os oligômeros em crescimento se tornam hidrofílicos o suficiente, eles entram nas gotas monoméricas, onde, essencialmente, a reação de polimerização prossegue (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002; TIARKS; LANDFESTER; ANTONIETTI, 2001). Os oligômeros podem, ainda, crescer até o ponto em que se tornam insolúveis e precipitam (nucleação heterogênea), o que leva à formação de nanopartículas menores em comparação aquelas formadas a partir da nucleação das gotas. Como o mecanismo de nucleação heterogênea é desfavorecido nas reações de miniemulsão inversa quando um iniciador hidrossolúvel é utilizado (CAPEK, 2010), esperava-se que as reações com KPS resultassem em nanogéis com tamanho de partícula ligeiramente maiores que aquelas com AIBN. O mecanismo associado a este comportamento não está bem claro, acredita-se, contudo, que o KPS possa ter também atuado como um agente osmótico, contribuindo para uma maior estabilidade da miniemulsão contra a degradação difusional.

A morfologia dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) dispersos em ciclohexano foram avaliadas por MEV e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 38. As imagens mostram que partículas submicrométricas e esféricas foram obtidas para ambos hidrogéis física e

quimicamente reticulados, sendo o tamanho médio de partícula observado nas microscopias compatível com aquele determinado por DLS. Em todas as amostras, foi observada a formação de filme devido ao aquecimento gerado pelo feixe de elétrons do microscópio, o que acabou dificultando bastante as análises e a captura de imagens. Este comportamento pode ser especialmente observado na Figura 38b. Por essa razão, as nanopartículas observadas apresentam aspecto ligeiramente achatado.

**Figura 38** - Imagens de MEV dos nanogéis de (a) P(L-AGA) e (b) P(L-AGA-co-BIS) (M2 e M6, Tabela 6) (placas de sílica preparada a partir de amostras dispersas em ciclohexano)



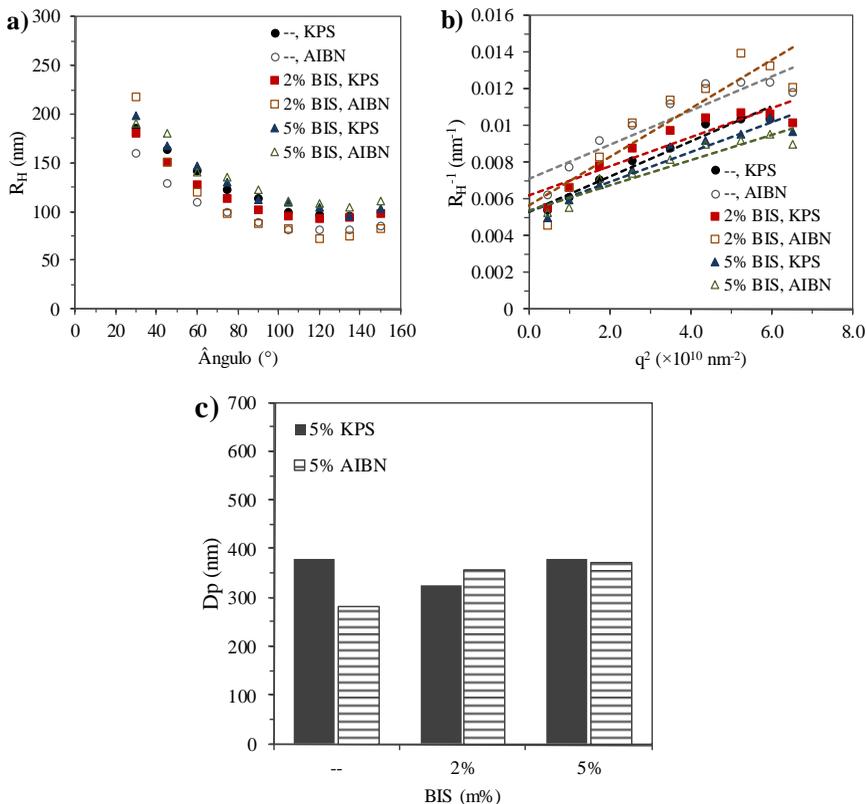
(Fonte: produção do autor)

As dispersões de nanogéis em ciclohexano apresentaram estabilidade por no máximo 3 dias a 4 °C. Para manter as características de tamanho de partícula e estabilidade, as nanopartículas foram redispersas em água em até 24 h após o processo de polimerização. O surfactante SDS foi adicionado à fase aquosa durante o processo de redispersão com o propósito de evitar a coagulação das nanopartículas, comportamento observado quando nenhum surfactante foi utilizado. Após completa remoção do ciclohexano, o SDS em excesso foi removido por uma série de lavagens com água destilada pura, e dispersões completamente translúcidas foram obtidas. De modo a garantir o completo intumescimento dos nanogéis, as dispersões foram mantidas em repouso durante 72 h a 4 °C antes da determinação de tamanho de partícula por DLS. O tamanho de partículas das amostras de nanogéis dispersos em água não pôde ser determinado utilizando o mesmo equipamento empregado para análise das dispersões de nanogéis em ciclohexano devido a interferências causadas pela presença das cadeias poliméricas não reticuladas de alta massa molar (que não puderam ser eliminadas durante o processo de purificação), as quais apresentavam tamanho entre 5 e 10 nm. Por essa razão, a fim de eliminar esta interferência, as análises de tamanho de partícula foram realizadas em um DLS multi-ângulo. Os resultados são apresentados na Figura 39.

As Figuras 39a e 39b têm significado semelhante e são ambas apresentadas para facilitar a discussão dos resultados. A Figura 39a apresenta a dependência angular do tamanho de partícula dos nanogéis (raio hidrodinâmico). Ao que pode ser observado, a redispersão dos nanogéis em água resultou em nanogéis polidispersos com tamanho variando entre 140-400 nm. É sabido, contudo, que as partículas maiores não só são mais “brilhantes” que as partículas menores em um sistema DLS, como também espalham mais luz em ângulos baixos do que em ângulos altos. Ou seja, a intensidade da luz espalhada por partículas grandes é maior em baixos ângulos, logo, as partículas maiores são mais facilmente detectadas por DLS quanto menor o ângulo de detecção (LAWRIE et al., 2009). Sendo assim, em um sistema polidisperso, para cancelar o efeito do ângulo de espalhamento e do tamanho de partícula sobre a intensidade de luz espalhada, e assim obter um o coeficiente de difusão aparente e, conseqüentemente, um valor de raio hidrodinâmico mais apropriado, os resultados obtidos por DLS multi-ângulo devem ser extrapolados para ângulo zero ( $q^2 \rightarrow 0$ , Figura 39b) (FRAUNHOFER et al., 2004; SOTO-CANTU et al., 2012). Com exceção da amostra preparada sem agente reticulante e com AIBN, todos os nanogéis intumescidos apresentaram tamanho de partícula de aproximadamente

350-370 nm, independentemente do iniciador utilizado. A comparação direta entre o tamanho de partícula dos nanogéis dispersos em ciclohexano e água é bastante delicada, visto que diferentes equipamentos e metodologias foram utilizadas para determinação do  $D_p$ . Além disso, não foi possível determinar o teor de gel dos nanogéis, conseqüentemente, não é possível inferir sobre o “encolhimento” das nanopartículas decorrente da perda de massa (polímero não reticulado) durante o processo de purificação, prejudicando, dessa forma, qualquer avaliação sobre a capacidade de absorção de água ( $V_{\text{inchado}}/V_{\text{não-inchado}}$ ) dos nanogéis.

**Figura 39** - Efeito do tipo de iniciador (KPS e AIBN) e concentração de reticulante (BIS) sobre  $D_p$  das nanopartículas de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) em água: (a) e (b) raio hidrodinâmico das partículas determinado por DLS multi-ângulo; (c) tamanho de partícula a  $0^\circ$  determinado por extrapolação das curvas em (b) (M2 – M7, Tabela 7).



(Fonte: produção do autor)

A encapsulação de compostos hidrofílicos nos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) foi avaliada através da encapsulação de cloridrato de doxorrubicina, um fármaco utilizado na quimioterapia contra diversos tipos de câncer, entre eles câncer de mama, ovário, estômago, leucemia e pulmão. A DOXO foi utilizada como fármaco modelo na concentração de 5% em massa (em relação à quantidade de monômero). As nanopartículas foram avaliadas segundo seu tamanho (em ciclohexano) e eficiência de encapsulação. Nanopartículas-branco, isto é, sem DOXO, foram utilizadas como controle. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

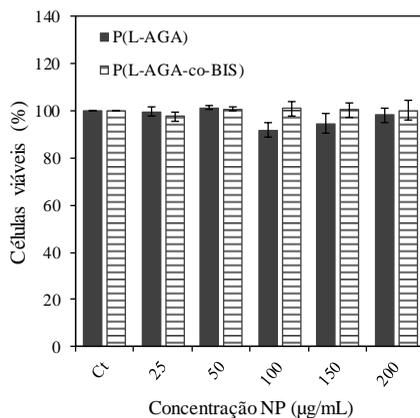
**Tabela 9** - Tamanho médio ( $D_p$ ), dispersão (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) preparadas por polimerização em miniemulsão inversa (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 4$ ).

Amostra	$D_p \pm DP$ (nm)	PDI $\pm DP$	EE (%)	Teor DOXO ( $mg_{doxo}/g_{pol}$ )
M2	205	0,075	—	—
M2-DOXO	258 $\pm$ 46	0,078 $\pm$ 0,012	84,7 $\pm$ 3,4	42,4 $\pm$ 1,7
M6	192	0,052	—	—
M6-DOXO	248 $\pm$ 19	0.059 $\pm$ 0.014	83,0 $\pm$ 7,8	41,5 $\pm$ 3,9

A incorporação de DOXO resultou em nanogéis com diâmetro médio aproximado de 250 nm e pouco polidispersos (em ciclohexano). Após redispersão em água e purificação para eliminação do SDS em excesso e do monômero e oligômeros não reticulados, a eficiência de encapsulação foi determinada em 84,7% e 83% para os nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS), respectivamente (tamanho de partícula em água não determinado). A perda/liberação de fármaco durante o período de estocagem foi também avaliada ao longo de 20 dias (dispersões armazenada a 4 °C e protegidas da luz, em duplicata). A cada intervalo de 5 dias, uma alíquota da dispersão de nanogéis em água (pH  $\sim$  5, não controlado) foi retirada e a quantidade de fármaco liberado determinada. Durante o período de armazenamento, observou-se uma perda de aproximadamente 5% do fármaco encapsulado, apenas, indicando que o fármaco se encontra predominantemente encapsulado e que somente uma pequena fração ficou adsorvida na superfície da partícula. Além disso, os resultados sugerem uma possível formação de ligações de hidrogênio entre o fármaco e o hidrogel, as quais impediram a difusão do fármaco para o meio aquoso nas condições de temperatura e pH avaliados.

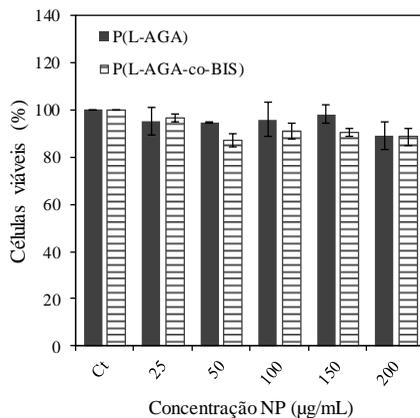
A fim de avaliar uma possível toxicidade dos sistemas nanoparticulados de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (amostras M2 e M6, respectivamente, Tabela 7), os nanogéis foram incubados com células HeLa (carcinoma uterino humano) e L929 nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 h (Figura 40 e 41).

**Figura 40** - Estudo da citotoxicidade dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (M2 e M6, Tabela 7) em cultura de células HeLa (barra de erros representam desvio padrão, n = 3).



(Fonte: produção do autor)

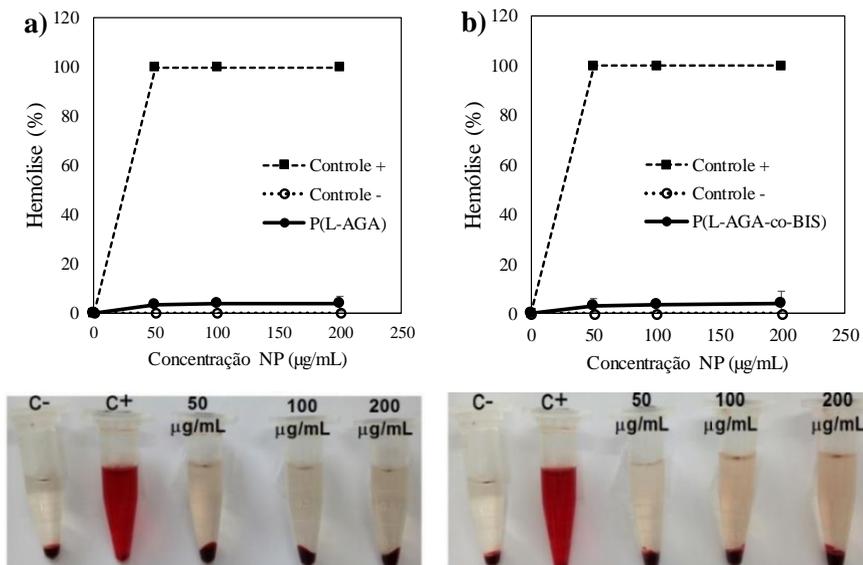
**Figura 41** - Estudo da citotoxicidade dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (M2 e M6, Tabela 7) em cultura de células L929 (barra de erros representam desvio padrão, n = 3).



(Fonte: produção do autor)

O uso de células L929 é recomendado pela ISO 10993-5 em ensaios de citotoxicidade *in vitro* de novos polímeros destinados para aplicação biomédica (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996). De acordo com a norma ISO 10993-5, compostos que reduzem a viabilidade celular em mais de 30%, em comparação com as células não tratadas, são considerados citotóxicos. Logo, os resultados obtidos indicam que os nanogéis não apresentaram nenhum efeito citotóxico acentuado sob as condições avaliadas. O impacto dos nanogéis de P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS) (amostras M2 e M6, respectivamente, Tabela 7) sobre glóbulos vermelhos humanos foi também avaliado através de ensaios de hemólise. As dispersões de nanogéis nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL (Figura 42) não causaram a hemólise das células vermelhas sanguíneas, indicando que ambos os sistemas não apresentam capacidade hemolítica, mesmo quando administrados em altas concentrações. Os resultados obtidos sugerem (1) que as nanopartículas derivadas de ácido glutâmico são biocompatíveis sob as condições avaliadas, e (2) que as substâncias potencialmente tóxicas utilizadas na síntese do monômero e preparação dos nanogéis não excedem a concentração crítica de toxicidade nas dispersões finais de nanogéis, não afetando a viabilidade celular, nem causando a destruição prematura das hemácias.

**Figura 42** - Ensaio de hemólise dos nanogéis de (a) P(L-AGA) (M2, Tabela 7) e (b) P(L-AGA-co-BIS) (M6, Tabela 7). Taxa relativa de hemólise após a incubação das nanopartículas por 24 h usando diferentes concentrações de nanopartículas. (barra de erros representam desvio padrão, n = 3).



(Fonte: produção do autor)

### 4.3 CONCLUSÕES

Neste capítulo, um monômero hidrossolúvel derivado de *L*-ácido glutâmico (*N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico) foi sintetizado via reação de Schotten-Baumann. Enquanto as reações de polimerização preparadas com concentrações de monômero inferiores a 20 m% resultaram em polímeros completamente hidrossolúveis, hidrogéis fisicamente reticulados foram obtidos quando mais de 30 m% de monômero foi utilizado. Hidrogéis quimicamente reticulados foram também sintetizados através da copolimerização dos monômeros *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico e *N,N'*-metilenobis(acrilamida). Ambos os polímeros obtidos, P(L-AGA) e P(L-AGA-co-BIS), mostraram-se sensíveis a variações no pH. Nos testes de intumescimento, os hidrogéis fisicamente reticulados de P(L-AGA) absorveram água até 350 vezes a sua massa, enquanto que aqueles quimicamente reticulados absorveram, no máximo, 15 vezes a sua massa em água. Adicionalmente, nanogéis de P(L-AGA) e

P(*L*-AGA-*co*-BIS) foram sintetizados via reações de polimerização em miniemulsão inversa. Nanopartículas intumescidas em água com diâmetro variando entre 270 e 370 foram obtidas, e nenhum efeito sobre o tamanho de partícula foi observado mediante a variação da quantidade de agente reticulante ou o tipo de iniciador utilizados. Cloridrato de doxorrubicina, utilizado como fármaco hidrofílico modelo, foi eficientemente encapsulado (83%) em ambos nanogéis de P(*L*-AGA) e P(*L*-AGA-*co*-BIS), resultando num teor de fármaco superior a  $41 \text{ mg}_{\text{doxo}}/\text{g}_{\text{pol}}$ . Os resultados obtidos neste capítulo, ainda que preliminares, sugerem que os nanogéis preparados via polimerização em miniemulsão são biocompatíveis e apresentam potencial aplicabilidade como sistemas carreadores de fármacos hidrofílicos com possibilidade de administração por via intravenosa.

## CAPÍTULO V

### 5 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREADORAS DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS VIA DUPLA EMULSÃO SEM USO DE SOLVENTES ORGÂNICOS<sup>1</sup>

Seguindo o desenvolvimento de lipossomos e nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram introduzidas no início da década de 1990 como um sistema carreador de fármacos eficiente e atóxico, constituído de lipídios naturais sólidos à temperatura ambiente (ALMEIDA; SOUTO, 2007; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SEVERINO et al., 2011). Lipídios de origem animal ou vegetal e surfactantes biocompatíveis e biodegradáveis são comumente empregados no preparo de dispersões de NLS e, por essa razão, não são esperados efeitos tóxicos agudos derivado da degradação das nanopartículas lipídicas sólidas (KUMAR; RANDHAWA, 2013; MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Devido à característica lipofílica da matriz lipídica, as NLS mostram-se bastante adequadas para a encapsulação de compostos hidrofóbicos. Compostos hidrofílicos, por outro lado, possuem pouca ou nenhuma afinidade com o lipídio e, por isso, tendem a migrar para o meio aquoso externo durante o processo de preparação das nanopartículas (ALMEIDA; SOUTO, 2007). No entanto, sob condições otimizadas, ambos os compostos lipofílicos e hidrofílicos podem ser eficientemente incorporados.

Sob a perspectiva de encapsulação de fármacos hidrofílicos, a técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente é amplamente empregada para alcançar eficiência de encapsulação satisfatória em ambas nanopartículas lipídicas sólidas e poliméricas (ALMEIDA; SOUTO, 2007; BILATI; ALLÉMAN; DOELKER, 2005; GARCÍA-FUENTES; TORRES; ALONSO, 2002; KHOEE; YAGHOBIAN, 2009; MOREL et al., 1996; ZHANG et al., 2006). Todavia, problemas toxicológicos podem eventualmente surgir em decorrência dos resíduos do solvente orgânico utilizado no processo de preparação da dispersão das nanopartículas (MEHNERT; MÄDER, 2001). Uma possível alternativa a este problema, é a preparação de nanopartículas lipídicas sólidas através da combinação das técnicas de dupla emulsão e dispersão a quente, onde um lipídio fundido é utilizado ao invés de uma solução de lipídio

<sup>1</sup>Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados em *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140 (2016) 317-323.

dissolvido em um solvente orgânico. Esta técnica foi empregada com sucesso por Bodmeier e colegas (1992) para preparar micropartículas lipídicas carreadoras de cloridrato de pseudoefedrina, e por Reithmeier e colaboradores (2001) para preparar micropartículas de tripalmitina carreadoras de peptídeos com alta eficiência de encapsulação. Pouco se sabe, contudo, sobre o efeito das variáveis de formulação sobre a produção de partículas lipídicas sólidas de tamanho submicrométrico via fusão/dupla emulsão. Não há registro na literatura científica sobre a preparação de nanopartículas lipídica sólidas através da técnica de dupla emulsão sem a utilização de solventes orgânicos.

Assim, neste capítulo é apresentado o estudo acerca da adaptação da técnica de fusão/dupla emulsão descrita por Bodmeier; Wang, Bhagwatwar (1992) e Reithmeier; Herrmann; Göpferich (2001) almejando-se a produção de nanopartículas lipídicas sólidas (ao invés de micropartículas) para encapsulação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Resultados aqui discutidos revelam o efeito de algumas variáveis de processo como, por exemplo, parâmetros de sonicação, tipo e concentração de surfactante e lipídio, sobre as características finais e estabilidade das miniemulsões.

## 5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1.1 Materiais

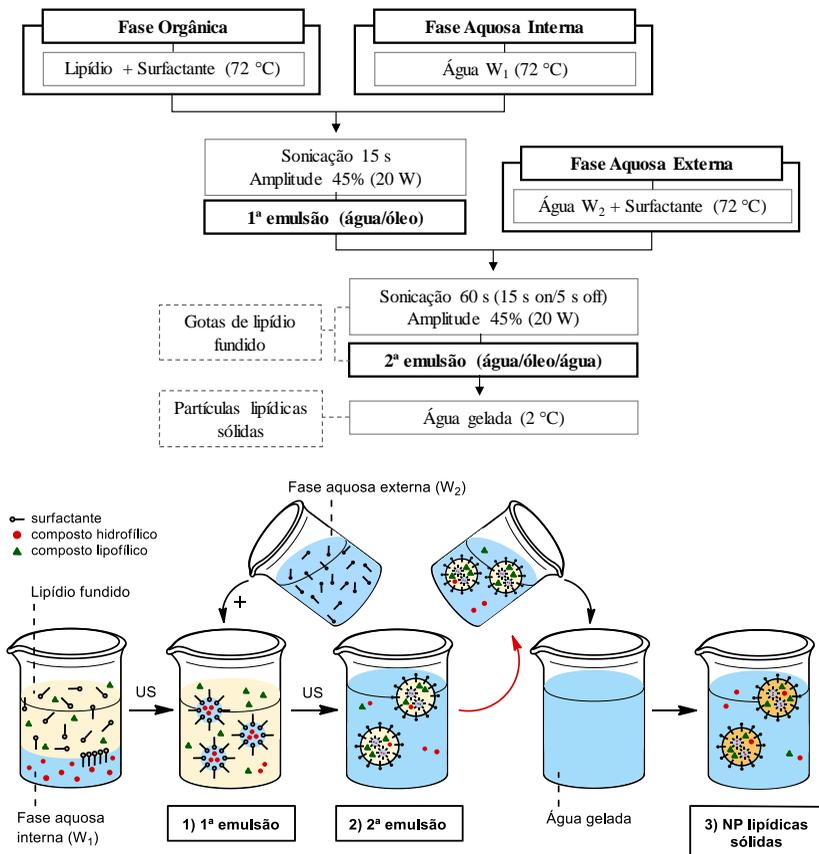
Foram utilizados ácido esteárico (Vetec, puro) e triacilgliceróis de ácido cáprico/caprílico (Crodamol GTCC, Alpha Química) como lipídios na preparação das nanopartículas lipídicas sólidas. Como surfactante: Lecitina (Alfa Aesar), polioxietileno-20-sorbitano monooleato (Tween 80, Vetec), sorbitano monooleato (Span 80, Oxiteno), Poloxamer 407 (Pluronic F127, Sigma-Aldrich) e Polirricinoleato de Poliglicerol (PGPR, Dhaymers). Como marcadores fluorescentes hidrofílico e hidrofóbico foram utilizados Sulfurodamina 101 (SR 101, Sigma-Aldrich) e 6-Coumarin (Sigma-Aldrich), respectivamente. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos. Os lipídios utilizados neste trabalho são considerados seguros e atóxicos sob o status Generally Recognized as Safe (GRAS) aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, órgão americano que fiscaliza e autoriza o comércio de alimentos e medicamentos, similar à Anvisa) (SEVERINO et al., 2011).

A Figura 43 apresenta a estrutura molecular dos surfactantes utilizados.



destilada gelada a 2 °C sob agitação branda. Em alguns experimentos, foi utilizada uma mistura de ácido esteárico e um lipídio líquido (Crodamol). Quando utilizado, o corante fluorescente hidrofóbico 6-coumarin (verde) foi previamente diluído em Crodamol e adicionado à fase orgânica antes da primeira etapa de sonicação. O corante fluorescente hidrofílico SR 101 (vermelho), por sua vez, foi diluído em água destilada e a solução foi adicionada como fase aquosa interna. Todos os experimentos foram feitos em triplicata ou mais. A Figura 44 apresenta o fluxograma e uma representação do processo de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas via fusão/dupla emulsificação.

**Figura 44** - Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico.



(Fonte: produção do autor)

A Tabela 10 apresenta as formulações adotadas na preparação das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico via fusão/dupla emulsão. Foram avaliadas formulações com diferentes tipos e concentrações de surfactantes e lipídios (ácido esteárico e crodamol).

### **5.1.3 Caracterização das Nanopartículas**

#### *5.1.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, Dynamic Light Scattering)*

O tamanho médio de partícula ( $D_p$ , em intensidade) e a dispersão (PDI), que fornece informações acerca da homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partícula, foram determinados utilizando um Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments) com ângulo do feixe incidente de  $173^\circ$ . As leituras foram realizadas a  $20^\circ\text{C}$  a partir de uma alíquota das miniemulsões sem prévia diluição. Todas as análises de DLS foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, UFSC.

#### *5.1.3.2 Potencial Zeta (PZ)*

O potencial zeta, que reflete o potencial elétrico de superfície das partículas e fornece informações acerca da estabilidade da formulação, foi determinado através da técnica de Anemometria de Laser Doppler associada à microeletroforese utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 3600 (Malvern Instruments). As leituras foram realizadas a  $25^\circ\text{C}$  a partir de uma alíquota das miniemulsões diluídas em água destilada até o teor de sólidos de 0,1%. As medidas de potencial zeta foram realizadas em triplicada de apenas uma amostra.

O potencial zeta pode ser utilizado como um indicativo da estabilidade das dispersões. Um sistema pode ser considerado estável quando as forças de repulsão eletrostática superam as forças atrativas de Van der Waals (HAN et al., 2008). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto ( $> 30\text{ mV}$ ) é importante para uma boa estabilidade físico-química do sistema coloidal, uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das partículas (HAN et al., 2008; HU et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2003).

**Tabela 10** - Formulações adotadas para preparação das nanopartículas via fusão/dupla emulsão.

Amostra	Ac. Esteárico (g)	Crodamol (g)	W <sub>1</sub> (µL) <sup>a</sup>	Surfactante Lipofílico	Surfactante Hidrofílico	Razão (%) <sup>b</sup>
F1	0,30	--	200	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F2	0,30	0,3	200	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F3	0,51	0,09	200	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F4	0,60	--	--	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F5	0,60	--	100	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F6	0,60	--	200	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F7	0,60	--	300	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F8	0,60	--	600	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F9	0,90	--	200	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F10	0,60	--	200	Lecitina (1,0%)	Tween 80 (5,0%)	1/5
F11	0,60	--	200	Span 80 (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F12	0,60	--	200	Span 80 (5,0%)	Tween 80 (10,0%)	5/10
F13	0,60	--	200	Span 80 (10,0%)	Tween 80 (10,0%)	10/10
F14	0,60	--	200	PGPR (1,0%)	Tween 80 (10,0%)	1/10
F15	0,60	--	200	PGPR (5,0%)	Tween 80 (10,0%)	5/10
F16	0,60	--	200	PGPR (10,0%)	Tween 80 (10,0%)	10/10
F17	0,60	--	200	Lecitina (1,0%)	Pluronic F127 (5,0%)	1/5
F18	0,60	--	200	Lecitina (1,0%)	Pluronic F127 (10,0%)	1/10
F19	0,60	--	200	Lecitina (1,0%)	Pluronic F127 (20,0%)	1/20

<sup>a</sup> Volume de Fase Aquosa Interna (W<sub>1</sub>).<sup>b</sup> Porcentagem em massa da concentração de surfactante em relação ao lipídio (surfactante 1 (%)/surfactante 2(%))

### 5.1.3.3 Eficiência de Encapsulação

A encapsulação dos marcadores fluorescentes hidrofílicos e hidrofóbicos nas nanopartículas de ácido esteárico foi avaliada por Microscopia de Fluorescência utilizando o microscópio epifluorescente invertido da marca Olympus, modelo Bx41, acoplado a um sistema de captura de imagens com câmera digital colorida de 3.3 Mpixels da Q-imaging alocado no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB II) da UFSC. As amostras para análise foram ultrafiltradas em Amicon Ultra-0.5 (Millipore, 100kDa) e ressuspensas em água destilada. As amostras foram observadas com lente objetiva de 100x e utilizando os filtros vermelho (U-MGW2) para o corante fluorescente SR 101 ( $\lambda_{\text{abs}} = 580 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ ) e verde (U-MWB2) para o corante fluorescente 6-coumarin ( $\lambda_{\text{abs}} = 458 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$ ).

A eficiência de encapsulação (EE) de ambos os corantes foi determinada conforme procedimento descrito anteriormente no item 3.1.7.5. A concentração de corante não encapsulado presente no sobrenadante foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Micronal AJX-1900) no comprimento de onda de 586 nm para o SR 101 (curva de calibração do em água com concentrações variando entre 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e 7,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e 460 nm para o 6-coumarin (curva de calibração do em acetona com concentrações variando entre 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as análises de UV-Vis foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, UFSC.

### 5.1.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia da nanopartículas lipídicas foi avaliada via MET em um equipamento da marca JEOL, modelo JEM-1011. As amostras para análise foram diluídas até teor de sólidos de 0,1% e uma gota (10  $\mu\text{L}$ ) foi colocada sobre grades de cobre de 300 mesh/ $\text{m}^2$  previamente recobertas com filme de parlódio. As grades foram, então, secas em temperatura ambiente, contrastadas negativamente com acetato de uranila (solução aquosa 5% m/v) durante 5 minutos, lavadas em água destilada e cobertas com filme de carbono. Por fim, as amostras foram analisadas sob tensão de 80 kV. Todas as análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), UFSC.

### 5.1.3.5 Caracterização térmica

A temperatura de fusão ( $T_m$ ) do lipídio foi determinada por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) utilizando um calorímetro Jade DSC (Perkin-Elmer) calibrado com zinco e índio. As análises foram realizadas com aproximadamente 2,0 mg de massa de amostra liofilizada, com taxa de aquecimento e resfriamento de 25 °C/min sob fluxo de nitrogênio gasoso de 20,0 mL/min. A amostra foi aquecida de 0 a 80 °C. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI), UFSC.

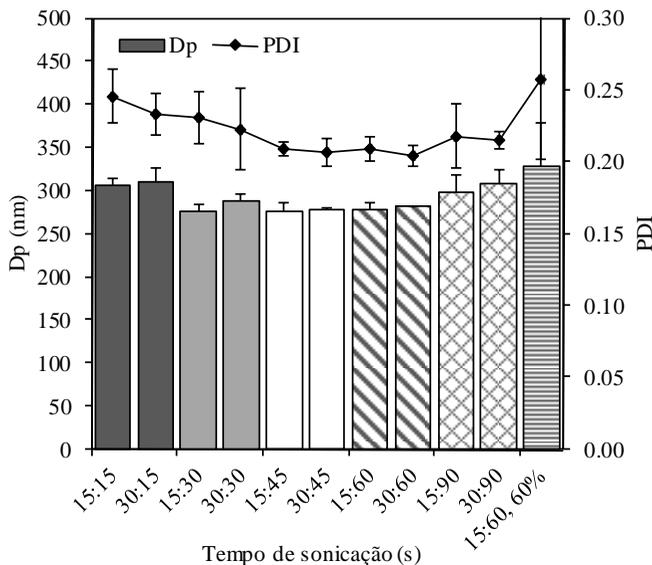
## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.2.1 Efeito das condições de sonicação

Originalmente utilizada na preparação de partículas de tamanho micrométrico ( $> 1 \mu\text{m}$ ), a técnica de fusão/dupla emulsão foi modificada neste estudo numa tentativa de obter partículas na escala nanométrica através do uso de sonicação nas duas etapas de emulsificação. Utilizando a técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente para preparar nanopartículas de PLGA, Bilati e colaboradores (2003) observaram que o tamanho das partículas de emulsões duplas é influenciado de forma mais acentuada pela segunda etapa de emulsificação do que pela primeira, sendo a sonicação por um maior período de tempo durante a segunda etapa de emulsificação a forma mais eficaz de reduzir o tamanho médio final das partículas.

Assim, para verificar a influência da etapa de sonicação na qualidade da dispersão final, as NLS foram preparadas utilizando diferentes condições de sonicação. O tempo de sonicação da primeira emulsificação foi variado entre 15 e 30 s, e da segunda entre 15 e 90 s, com 45% de amplitude (a menos que indicado de maneira diferente). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 45 - Efeito do tempo de sonicação (1ª emulsão:2ª emulsão) sobre  $D_p$  e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ). Em todos os experimentos foi utilizada a formulação F6, Tabela 10.

**Figura 45** - Efeito do tempo de sonicação (1ª emulsão:2ª emulsão) sobre Dp e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ).



(Fonte: produção do autor)

Todos os tempos de sonicação avaliados resultaram em partículas de tamanho submicrométrico. Como era esperado, o aumento do tempo de sonicação de 15 para 30 s durante a primeira etapa de emulsificação não exerceu efeito significativo sobre o tamanho de partícula. Por outro lado, foram observadas pequenas diferenças no tamanho de partícula e na distribuição de tamanho de partículas quando diferentes tempos de sonicação foram utilizados na segunda etapa de emulsificação. Para fins de comparação, o tempo 15:15s resultou em nanopartículas de 310 nm, enquanto que nanopartículas de aproximadamente 275 nm foram obtidas para tempos de sonicação 15:45 e 15:60 s. Também foram obtidas distribuições de tamanho mais estreitas quando o tempo de sonicação na segunda etapa de emulsificação foi aumentada para até 60 s. Contudo, quando 90 s ou maior amplitude de sonicação (60%) foram utilizados, um aumento do Dp e PDI foi observado. Este último comportamento observado pode ser atribuído a uma leve desestabilização do sistema causado pelo aumento da energia cedida ao sistema durante a sonicação mais longa e/ou intensa, o que levou à formação de partículas menores e a um aumento da área superficial. Neste caso, o surfactante adicionado à

emulsão não foi suficiente para recobrir adequadamente a alta área superficial das pequenas nanogotas, resultando numa menor estabilidade coloidal. Um efeito similar foi observado por Huang, Sudol, Dimonie (2006) em relação à estabilidade de miniemulsões de estireno.

## 5.2.2 Efeito do tipo e concentração de surfactante

Para aumentar a estabilidade de miniemulsões, surfactantes são aplicados com o objetivo de minimizar ou retardar a agregação das partículas. A escolha do tipo e da concentração do surfactante desempenha um papel importante na estabilização das gotas e das partículas sólidas obtidas ao final do processo de preparo (MUSYANOVYCH et al., 2008). A principal função do agente estabilizante é reduzir a tensão interfacial entre o meio disperso e contínuo, sendo que o aumento da concentração de surfactante tende a refletir inversamente no tamanho de partícula (KHERADMANDNIA et al., 2010; MEHNERT; MÄDER, 2001; MUSYANOVYCH et al., 2008).

É sabido que sistemas nanoestruturados lipídicos preparados com uma combinação de surfactantes tendem a resultar em miniemulsões com menor tamanho médio de partícula e a apresentar maior estabilidade durante o período de estocagem do que aqueles preparados com um único surfactante (GARCÍA-FUENTES; TORRES; ALONSO, 2002; KHERADMANDNIA et al., 2010; LIM; KIM, 2002; MEHNERT; MÄDER, 2001). Além disso, alguns autores sugerem que a combinação de surfactantes hidrofílicos e lipofílicos na preparação de nanopartículas por dupla emulsificação é importante do ponto de vista de estabilização das nanopartículas e de aumento da eficiência de encapsulação de compostos hidrofílicos (KHOEE; YAGHOBIAN, 2009; PAL, 2007).

Por essa razão optou-se em utilizar dois surfactantes na preparação das nanopartículas de ácido esteárico: um lipofílico, dissolvido na fase orgânica, e outro hidrofílico, dissolvido na fase aquosa externa. Foram avaliados quatro grupos de surfactantes: Lecitina e Tween 80 (Lec/T80), Lecitina e Pluronic F127 (Lec/Pluronic), Span 80 e Tween 80 (Span/T80) e PGPR e Tween 80 (PGPR/T80). A lecitina tem caráter anfótero e lipofílico, Span 80 e PGPR não-iônico e lipofílico, Tween 80 e Pluronic F127 não-iônico e hidrofílico. O efeito do tipo e concentração de surfactante exercido sobre o tamanho médio de partícula, dispersão, potencial zeta e estabilidade das nanopartículas está apresentado na Tabela 11 e Figura 46. Foi utilizado, em todos os experimentos, 0,6 g de ácido esteárico e 200 µL de fase aquosa interna.

**Tabela 11** - Efeito do tipo e concentração de surfactante sobre Dp, PDI e PZ das nanopartículas de ácido esteárico (Média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ).

Surfactantes	Proporção (m%) <sup>a</sup>	Dp $\pm$ DP (nm)	PDI $\pm$ DP	ZP $\pm$ DP (mV) <sup>b</sup>
Lec/T80	1/5	304 $\pm$ 4	0,206 $\pm$ 0.037	-58,2 $\pm$ 1,4
	1/10	277 $\pm$ 8	0,290 $\pm$ 0.009	-52,7 $\pm$ 0,6
Lec/Pluronic	1/5	389 $\pm$ 31	0,212 $\pm$ 0.032	-41,9 $\pm$ 1,8
	1/10	406 $\pm$ 51	0,225 $\pm$ 0.020	-43,5 $\pm$ 1,3
	1/20	318 $\pm$ 24	0,215 $\pm$ 0.031	-35,7 $\pm$ 1,4
Span/T80	1/10	437 $\pm$ 42	0,276 $\pm$ 0.017	-39,1 $\pm$ 1,8
	5/10	453 $\pm$ 48	0,282 $\pm$ 0.049	-34,4 $\pm$ 1,2
	10/10	549 $\pm$ 178	0,376 $\pm$ 0.159	-31,7 $\pm$ 0,6
PGPR/T80	1/10	411 $\pm$ 11	0,254 $\pm$ 0.018	-30,7 $\pm$ 0,5
	5/10	393 $\pm$ 7	0,268 $\pm$ 0.010	-30,9 $\pm$ 0,2
	10/10	367 $\pm$ 3	0,273 $\pm$ 0.042	-35,8 $\pm$ 0,4

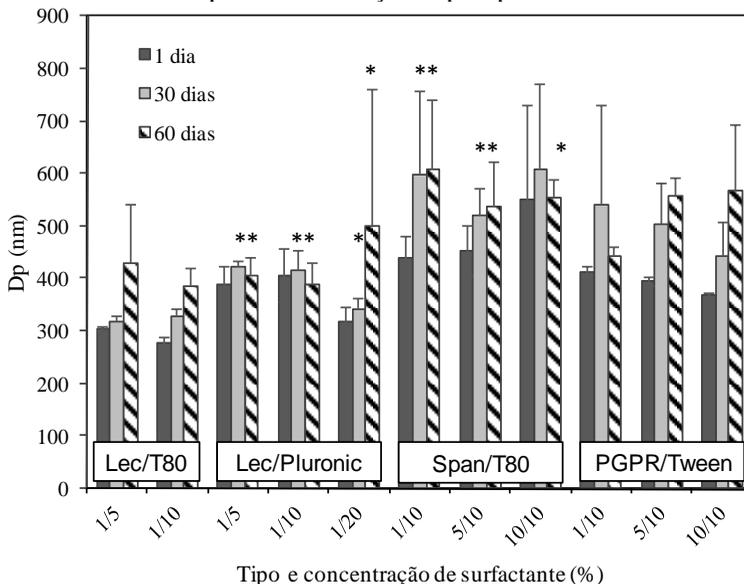
<sup>a</sup> Porcentagem em massa de surfactante em relação ao lipídio (surfactante 1 (%)/surfactante 2(%))

<sup>b</sup> Triplicata da medida

Todos os sistemas avaliados resultaram em dispersões estáveis com partículas na escala nanométrica (270 a 550 nm). As quatro combinações de surfactantes avaliadas apresentaram diferentes eficiências de estabilização e, conseqüentemente, diferentes tamanhos médio de partícula e dispersão. Independentemente da concentração de surfactante avaliada, a combinação lectina/Tween 80 resultou em nanopartículas de menor diâmetro médio (277 – 305 nm), enquanto que o par Span/Tween resultou nas maiores (385 – 550 nm). A escolha do surfactante também exerceu efeito acentuado sobre o potencial zeta. Todas as amostras avaliadas apresentaram módulo do potencial zeta superior a 30 mV. A carga superficial negativa, observada mesmo quando surfactantes não-iônicos foram utilizados, pode ser atribuído à carga negativa natural do ácido esteárico (PALIWAL et al., 2009; VARSHOSAZ; MINAYIAN; MOAZEN, 2010). Nas nanopartículas em que a lecitina foi utilizada como surfactante, um valor absoluto ainda maior do potencial zeta foi observado, possivelmente devido ao caráter anfótero da lecitina (SCHAFFAZICK et al., 2003). Em contrapartida, os surfactantes Tween 80 e Pluronic atuaram como agentes de blindagem, resultando na diminuição do potencial zeta. Tensioativos não-iônicos derivados de copolímeros dos óxidos de etileno e propileno como o Pluronic F 127, por

exemplo, tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (SCHAFFAZICK et al., 2003).

**Figura 46** - Estabilidade das dispersões de nanopartículas sólidas de ácido esteárico estocadas a 4°C (Média ± DP, n ≥ 2). \*Pelo menos uma das dispersões apresentou formação de precipitado.



(Fonte: produção do autor)

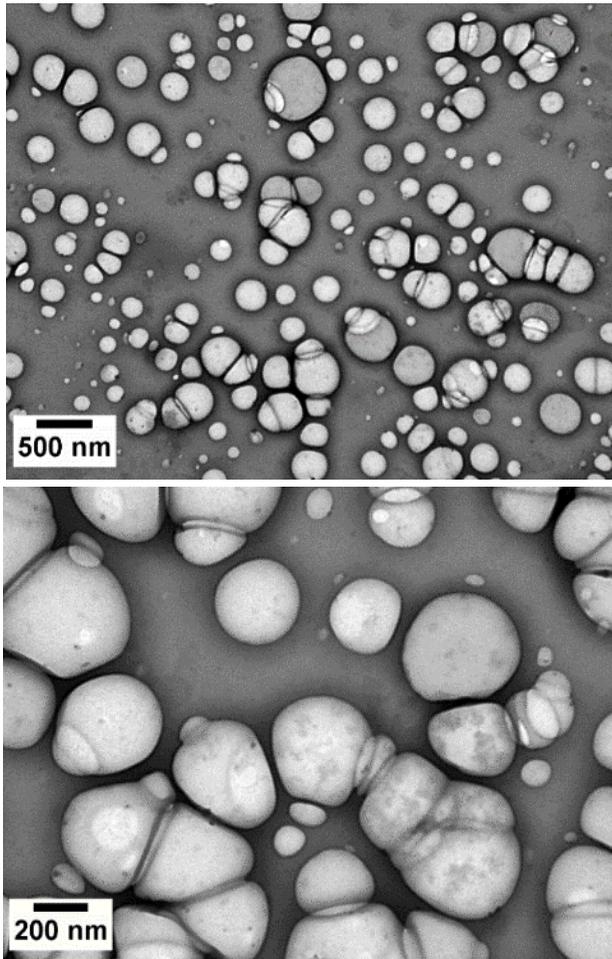
Em relação à proporção dos surfactantes lecitina/Tween 80, é importante observar que o tamanho de partícula diminuiu com o aumento da concentração de Tween 80 de 5,0 para 10,0% (concentração de lecitina mantida constante em 1,0%), o que pode ser atribuído a um efeito estérico adicional provido pela maior quantidade de Tween 80. Quando a lecitina foi combinada com Pluronic F127, por outro lado, a aglomeração das nanogotas lipídicas durante a homogeneização não foi eficientemente evitada, e partículas maiores (320 – 406 nm) com distribuições de tamanho mais largas foram obtidas, mesmo a uma concentração mais elevada de Pluronic (20%). A diferença entre os dois sistemas de surfactantes (lecitina/Tween 80 e lecitina/Pluronic F127) é ainda mais evidente quando a estabilidade das dispersões a longo prazo é avaliada (Figura 46). Apesar dos elevados valores de potencial zeta obtidos para todas as dispersões e do efeito estabilizante estérico promovido pelos surfactantes Tween 80 e Pluronic, após 30 dias à 4 °C, um pequeno

aumento do tamanho de partículas foi observado nas NLS preparadas utilizando lecitina e Tween 80, enquanto que aquelas preparadas com lecitina/Pluronic F127 sofreram agregação e sedimentaram (o conjunto de amostras que apresentou precipitação de pelo menos uma formulação foi representado com um asterisco (\*) na Figura 46).

Ainda que Tween 80 seja frequentemente combinado com Span 80 em duplas emulsões em virtude da sua estrutura e comprimento da cadeia hidrocarbônica similares (SCHMIDTS et al., 2009), esta combinação não foi tão eficiente na estabilização das miniemulsões sob as condições experimentais avaliadas. Tamanho médio de partícula variando entre 435 e 550 nm e dispersão de até 0,370, característico de distribuições bimodais, foram obtidos. Além disso, ao contrário do que seria esperado considerando os altos valores de potencial zeta, Span 80/Tween 80 foram ineficazes na manutenção da estabilidade das dispersões à 4 °C, e a sedimentação das partículas foi observada na maioria das amostras. Uma diminuição do tamanho de partícula foi observado quando o Span 80 foi substituído por PGRP, um surfactante reconhecidamente eficaz na estabilização de emulsões inversas água/óleo (HECHT et al., 2012). Contudo, mesmo quando uma alta concentração de PGPR e Tween 80 foi utilizada, o menor tamanho de partícula obtido foi 365 nm.

Nenhum dos conjuntos de surfactantes foi eficiente na preservação das propriedades físicas das dispersões por mais do que 60 dias. A agregação das partículas e um subsequente aumento do tamanho médio de partícula foram observados em todas as amostras ao longo dos 60 dias do estudo. Durante o período analisado, algumas amostras perderam a estabilidade e houve a formação de precipitado. Após 30 dias de estocagem a 4°C, as amostras preparadas com lecitina apresentaram um aumento médio do tamanho de partícula de aproximadamente 7% em relação ao tamanho registrado logo após o preparo, enquanto que aquelas preparadas com Span ou PGPR sofreram um aumento médio aproximado de 26%. Ao final de 60 dias, foi observado um aumento de aproximadamente 28% e 35% para o grupo de amostras preparadas com e sem lecitina, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que, de maneira semelhante ao reportado na literatura (BUMMER, 2004; KHERADMANDNIA et al., 2010), a combinação dos efeitos estabilizantes estérico e eletrostático garante uma melhor estabilização da dispersão e minimiza a agregação das nanopartículas com maior eficiência. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de ácido esteárico preparadas utilizando o par Lecitina/Tween 80 na concentração de 1/10% estão apresentadas na Figura 47.

**Figura 47** - Imagens de MET das nanopartículas de ácido esteárico preparadas com o par Lectina/Tween na concentração de 1/10% (Amostra F6, Tabela 10).

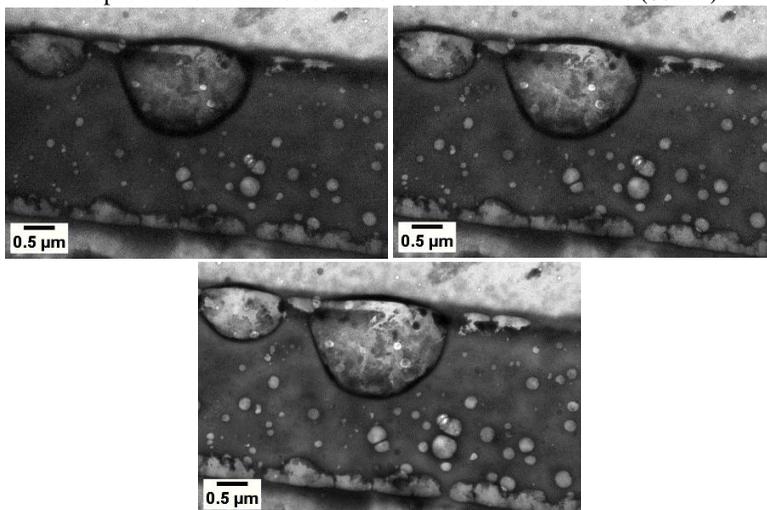


(Fonte: produção do autor)

Apesar do recobrimento das amostras com filme de carbono antes das análises de MET, não foi possível evitar a fusão do lipídio sob o feixe de elétrons, como pode ser observado na Figura 48, dificultando bastante a análise acerca da morfologia da partícula (nanoesfera ou nanocápsula). Durante as análises de MET foi possível observar um rápido aumento do tamanho de partícula durante os primeiros segundos da incidência do

feixe de elétrons devido a fusão do lipídio. A partir deste ponto, o tamanho de partícula manteve-se estável (não aumentou ou diminuiu) independentemente do tempo de exposição ao feixe. Isto indica que o tamanho das partículas observadas nas imagens da Figura 47 é ligeiramente maior do que o real, uma vez que foram registradas após a estabilização do tamanho de partícula. De modo geral, as nanopartículas obtidas são esféricas e apresentam tamanho médio e distribuição de tamanho compatíveis com aqueles observados por DLS

**Figura 48** - Imagens de MET em sequência exemplificando a modificação das nanopartículas de ácido esteárico com o feixe de elétrons (80 kV).



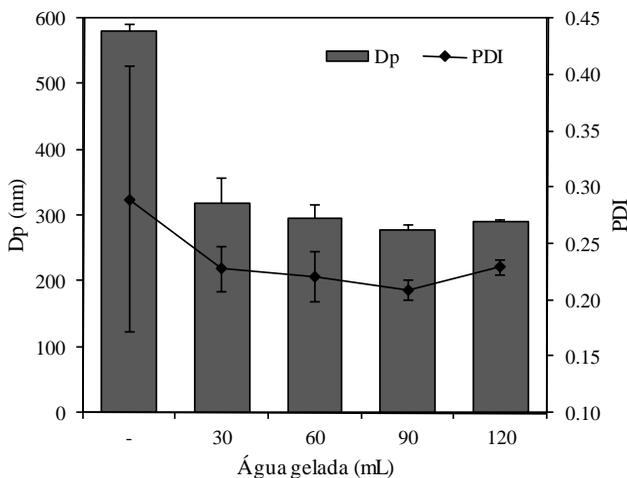
(Fonte: produção do autor)

### 5.2.3 Efeito do volume de água gelada

A solidificação das nanogotas lipídicas em nanopartículas lipídicas sólidas é promovida pela rápida recristalização do lipídio durante o processo de resfriamento, quando a dupla emulsão quente é dispersa em água gelada (2-5 °C). A diferença de temperatura entre a miniemulsão e a água gelada, bem como o volume de água gelada utilizado, são parâmetros que influenciam diretamente o tamanho final das nanopartículas (SOUTO et al., 2011). O efeito do volume de água gelada sobre o diâmetro médio e dispersão das nanopartículas de ácido esteárico preparadas via fusão/dupla emulsificação foi avaliado. Cinco formulações

foram avaliadas, nas quais a dupla emulsão foi resfriada em banho de gelo ou pela adição à 30, 60, 90 e 120 mL de água resfriada à 2 – 5 °C. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 49. Em todos os experimentos foi utilizada a formulação F6, Tabela 10.

**Figura 49** - Efeito do volume de água gelada sobre Dp e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média ± DP, n≥3).



(Fonte: produção do autor)

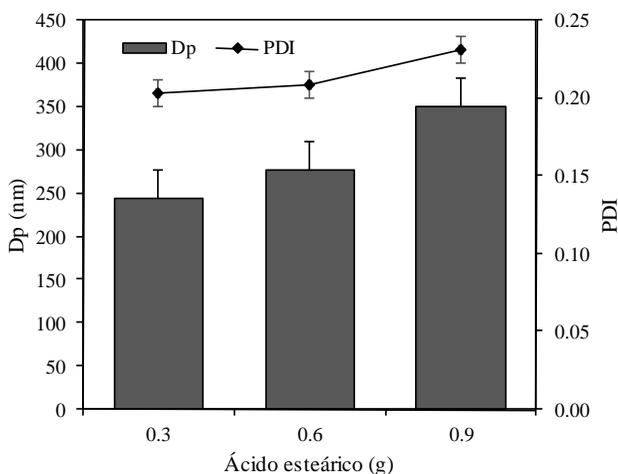
O aumento do volume de água gelada teve um efeito inverso sobre o tamanho da partícula e dispersão. É possível observar uma tendência à diminuição do tamanho médio de partícula e um estreitamento da distribuição do tamanho de partícula com o aumento do volume de diluição. Quando apenas o banho de gelo foi utilizado para resfriar a dupla emulsão, partículas de aproximadamente 580 nm foram obtidas. Partículas com quase metade desse tamanho (277 – 320 nm) foram obtidas quando água gelada foi utilizada para acelerar o processo de solidificação do lipídio. O aparente mecanismo responsável por este fenômeno é a maior proximidade das gotas e partículas sólidas recém-formadas durante o processo de solidificação quando apenas o banho de gelo foi utilizado, o que aumenta a probabilidade de colisão entre as gotas/partículas e agregação. Devido à instabilidade termodinâmica das gotas lipídicas e sua forte tendência à coalescência e floculação (BENICHO; ASERIN; GARTI, 2004), um processo de resfriamento mais demorado aliado a uma maior proximidade entre as gotas/partículas favoreceu a coalescência das gotas/partículas, resultando em partículas

maiores (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1996). Observou-se, também, que existe uma ligeira tendência à diminuição do tamanho de partícula e estreitamento da distribuição do tamanho de partícula com o aumento do volume de água fria de 30 a 90 mL (320, 295, 277 nm, respectivamente). Este comportamento implica que durante o processo de solidificação do lipídio, ainda que sejam obtidas gotas esféricas e eletrostaticamente protegidas pelo surfactante, o processo de coalescência será mais acentuado quanto menor for o distanciamento entre elas (maior probabilidade de choques e colisões) (SOUTO et al., 2011).

#### 5.2.4 Efeito da concentração e composição de lipídio

O efeito da concentração de ácido esteárico adicionado à formulação foi também investigado. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 50.

**Figura 50** - Efeito da concentração de ácido esteárico sobre Dp e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ).



(Fonte: produção do autor)

Como era esperado, o aumento da concentração de lipídio resultou no aumento do tamanho final de partícula e em distribuições de tamanho de partícula mais largas. Mediante o aumento da concentração de ácido esteárico de 0,3 para 0,9 g, um aumento no tamanho de partícula de 250 para 350 nm e PDI de 0,20 para 0,23 foi observado. Esse comportamento

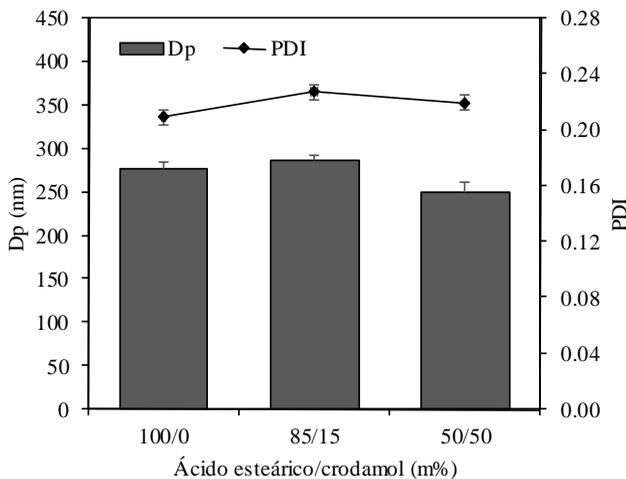
foi também observado por outros autores quando avaliada a influência da quantidade de polímero adicionado na preparação de nanopartículas poliméricas (KWON et al., 2001; MAINARDES; EVANGELISTA, 2005; O'DONNELL; MCGINITY, 1997; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1996; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Uma vez que todos os outros parâmetros foram mantidos constantes em todos os experimentos, este resultado pode ser atribuído a um processo de sonicação menos eficiente causado pelo aumento de volume e viscosidade derivados do aumento da quantidade de lipídio.

A cristalização do lipídio é um fator importante que deve ser considerado em nanopartículas lipídicas sólidas carreadoras de fármaco para liberação controlada. Os lipídios como, por exemplo, o ácido esteárico, podem apresentar polimorfismo, isto é, podem se cristalizar em diferentes formas, criando estruturas diferenciadas e com distinta estabilidade. A organização tridimensional que a matriz lipídica adquire durante a solidificação depende principalmente da velocidade de resfriamento e da composição do lipídio. As transformações polimórficas visam a uma maior estabilidade termodinâmica, e podem inclusive ser observadas durante o tempo de armazenamento das nanopartículas, o que acaba promovendo a expulsão do fármaco e resultando na diminuição da eficiência de encapsulação (HAN et al., 2008; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SEVERINO et al., 2011; SOUTO et al., 2011). Uma matriz lipídica menos ordenada pode ser benéfica do ponto de vista da encapsulação de fármacos, dado que em um empacotamento cristalino imperfeito há mais espaço disponível para acomodar as moléculas de fármaco, favorecendo a eficiência de encapsulação (HU et al., 2005). A combinação de diferentes tipos de lipídios sólidos e líquidos, com diferentes tamanhos de cadeia, é uma forma bastante conveniente de prejudicar a cristalização do lipídio.

Um triacilglicerol de cadeia média composto principalmente de ácido cáprico/caprílico (crodamol GTCC) foi misturado com ácido esteárico numa tentativa de perturbar a cristalização do ácido esteárico nas nanopartículas. O efeito da proporção de crodamol e ácido esteárico sobre o tamanho e a distribuição do tamanho de partícula foi avaliado e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 51. É possível observar que nanopartículas lipídicas preparadas com uma proporção de 50% em peso de crodamol (formulação F2, Tabela 10) são menores que aquelas preparadas apenas com ácido esteárico. Este comportamento pode ser atribuído à diferença de viscosidade entre o ácido esteárico e o crodamol. A adição de grande quantidade de crodamol possibilitou a redução da viscosidade da fase orgânica, resultando, conseqüentemente, em um

processo de emulsificação mais eficiente e em partículas menores devido a uma redução da resistência às forças de cisalhamento aplicadas durante o processo de sonicação (KWON et al., 2001; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1996; SOUTO et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Hu e colaboradores (2005) quando avaliado o efeito da adição de ácido oleico em nanopartículas de ácido esteárico.

**Figura 51** - Efeito da proporção Ácido Esteárico/Crodamol sobre o  $D_p$  e PDI das nanopartículas de ácido esteárico (Média  $\pm$  DP,  $n \geq 2$ ).

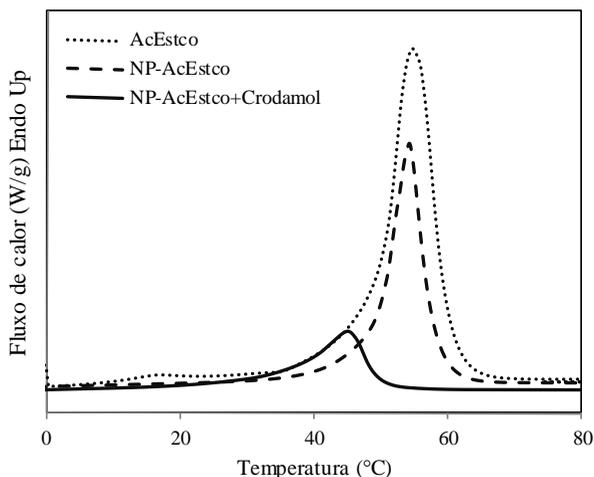


(Fonte: produção do autor)

Análises de DSC foram realizadas a fim de verificar o comportamento de cristalização do ácido esteárico mediante a adição de crodamol. A Figura 52 mostra as curvas DSC de ácido esteárico (AcEstco), das nanopartículas de ácido esteárico (NP-AcEstco) e ácido esteárico/crodamol (85/15%, NP-AcEstco+Crodamol). As temperaturas de fusão ( $T_m$ ) e entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ) de cada amostra estão apresentadas na Tabela 12. Ainda que não tenha sido observada uma alteração pronunciada na  $T_m$  das nanopartículas de ácido esteárico (54,2 °C) (em relação ao ácido esteárico puro, 54,6 °C), uma diferença de quase 10 °C foi observada na  $T_m$  das nanopartículas preparadas com uma mistura de ácido esteárico e crodamol (45,2 °C). O grau de desordem cristalina de lipídicos pode ser estimado medindo-se a extensão da fusão cristalina, a qual pode ser calculada pela diferença entre as temperaturas de fusão e de onset ( $T_{onset}$  corresponde ao início extrapolado do evento térmico).

Quanto maior a diferença, maior é a desordem cristalina (SEVERINO et al., 2011). Para o ácido esteárico puro, essa diferença foi de 6,5, enquanto que para as nanopartículas de ácido esteárico e ácido esteárico/crodamol foi de 6,1 e 11,9, respectivamente. Estes resultados indicam que através da adição de crodamol foi possível perturbar a ordem cristalina do ácido esteárico.

**Figura 52** - Curvas de DSC do ácido esteárico puro (AcEstco), nanopartículas de ácido esteárico (NP-AcEstco) e nanopartículas de ácido esteárico/crodamol (NP-AcEstco+crodamol, 85/15%).



(Fonte: produção do autor)

**Tabela 12:** Temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura onset de fusão ( $T_{onset}$ ), entalpia de fusão cristalina ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalização ( $\chi_c$ )

Amostra	$T_m$ (°C)	$T_{onset}$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\chi_c$ (%) <sup>a</sup>
AcEstco	54,6	48,1	431,6	100,0
NP-AcEstco	54,2	48,6	246,2	57,0
NP-AcEstco+Crodamol	45,2	33,3	103,2	23,9

<sup>a</sup>Grau de cristalinidade relativa.

O grau de cristalinidade das amostras também deve ser levado em consideração nesse caso (Tabela 12). A cristalinidade ( $\chi_c$ ) do ácido esteárico pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{AcEstco}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 7})$$

onde  $\Delta H_m$  and  $\Delta H_{AcEstco}$  correspondem, respectivamente, à entalpia de fusão cristalina da amostra e do ácido esteárico 100% cristalino. Para os cálculos, considerou-se o ácido esteárico puro como 100% cristalino (cristalinidade relativa).

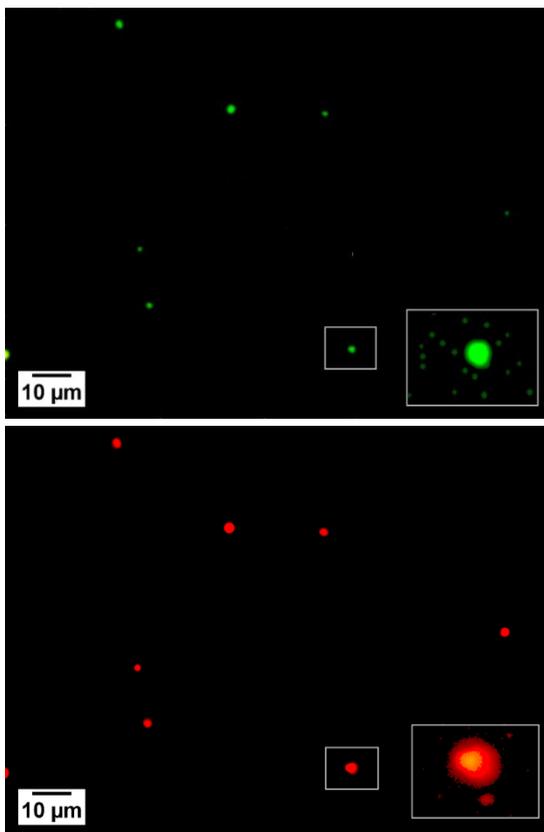
Os resultados acima sugerem que a própria preparação das NLS pode parcialmente inibir a cristalização do ácido esteárico e que uma diminuição adicional do grau de cristalinidade pode ser alcançada através da combinação do ácido esteárico com um lipídio líquido, tal como o crodamol. Hu e colaboradores (2005) mostraram que a redução do grau de cristalinidade do ácido esteárico é proporcional ao aumento do teor de lipídio líquido.

### 5.2.5 Eficiência de Encapsulação

Um dos grandes desafios da dupla emulsão é a instabilidade termodinâmica de emulsões inversas, principalmente na escala nanométrica. Em virtude da grande quantidade de energia cedida ao sistema durante o processo de sonicação, existe uma forte tendência à ruptura das gotas de água e quebra da primeira emulsão durante o processo de obtenção da segunda emulsão, o que acabaria levando à formação de uma emulsão simples (nanoesferas) ao invés de uma emulsão dupla (nanocápsulas com núcleo aquoso), resultando em uma baixa eficiência de encapsulação. A incorporação de marcadores fluorescentes às nanopartículas lipídicas foi utilizada para verificar se a adaptação proposta para produção de nanopartículas lipídicas através da técnica de fusão/dupla emulsão é apropriada para encapsulação de compostos hidrofílicos. A encapsulação de compostos hidrofílicos foi avaliada através da encapsulação simultânea de dois marcadores fluorescentes: um hidrofílico (SR 101, vermelho) e outro hidrofóbico (6-coumarin, verde). As imagens obtidas por microscopia de fluorescência estão apresentadas na Figura 53. Para fins de controle, foram preparadas nanopartículas sem marcador e com ambos os corantes encapsulados separadamente, e nenhuma interferência nas análises foi observada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata utilizando a formulação F6 da Tabela 10. A Figura 53 mostra as mesmas partículas sob efeito de diferentes filtros: o vermelho, para o corante fluorescente hidrofílico SR 101, e o verde, para o corante fluorescente lipofílico 6-coumarin. Pode-se observar que as nanopartículas que brilham em verde na primeira imagem, também brilham em vermelho na segunda, indicando que houve a encapsulação do corante hidrofílico.

Devido à baixa magnificação alcançada pelo microscópio (aumento de 100x), apenas ficaram visíveis as maiores partículas, com  $D_p > 1 \mu\text{m}$ . As partículas menores, nanométricas, apenas tornam-se visíveis através da manipulação das imagens (com auxílio de um software) através do aumento da magnificação e do contraste (imagens em detalhe). Contudo, isto acaba resultando na saturação do vermelho, prejudicando a qualidade da imagem.

**Figura 53** - Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de nanopartículas lipídicas preparadas com a incorporação simultânea do marcador hidrofílico (SR-101) e lipofílico (6-coumarin). Na ordem: microscopia com fluorescência filtro verde e com fluorescência filtro vermelho.

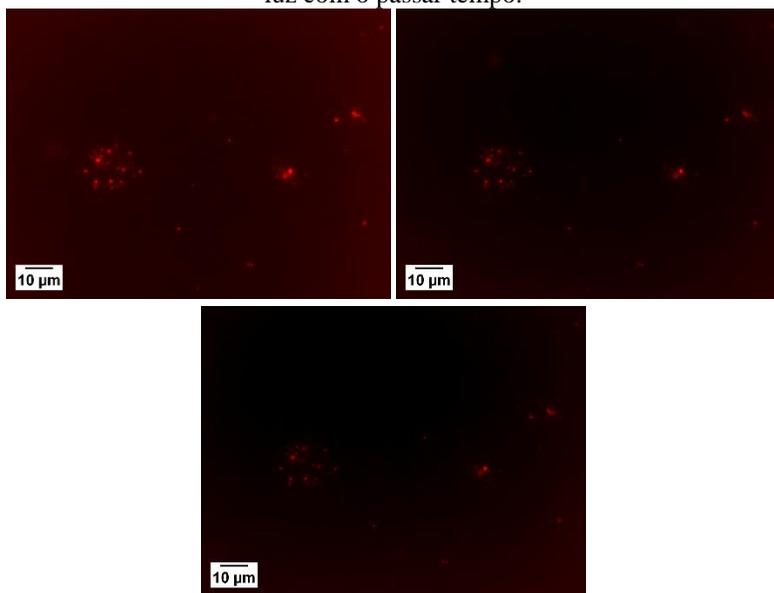


(Fonte: produção do autor)

Durante as análises de microscopia foi observada a degradação

(perda de fluorescência) do corante hidrofílico livre (não encapsulado) com a incidência do feixe de luz com o decorrer do tempo. Contudo, o mesmo comportamento não foi observado na fração do corante encapsulado nas partículas (Figura 54) com a mesma intensidade, sugerindo que a matriz lipídica atuou de forma protetora sobre as moléculas do corante. Estes resultados também indicam que o marcador fluorescente se encontra predominantemente encapsulado nas partículas lipídicas e não apenas adsorvido à sua superfície.

**Figura 54** - Efeito da degradação do marcador hidrofílico com o feixe de luz com o passar tempo.



(Fonte: produção do autor)

A eficiência de encapsulação dos corantes SR 101 e 6-coumarin em nanopartículas lipídicas de ácido esteárico e ácido esteárico/crodamol (50/50%) foi também avaliada quantitativamente por espectrofotometria de UV-Vis (Tabela 13). Nas NLS preparadas com ácido esteárico, SR-101 foi encapsulado com 63% de eficiência. Por outro lado, ao contrário do que seria esperado, quando uma mistura de ácido esteárico e crodamol foi utilizada, a eficiência de encapsulação diminuiu para 28%, o que pode ser atribuído a uma maior perda de corante hidrófilo para a fase aquosa externa, uma vez que uma matriz lipídica mais “macia” foi utilizada. O

corante 6-coumarin também foi incorporado com elevada eficiência de encapsulação (95%), mostrando que a técnica de dupla emulsão é adequada para a encapsulação de ambos os compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Não foi possível determinar a eficiência de encapsulação por espectroscopia UV-Vis quando ambos os corantes foram simultaneamente encapsulados devido à interferência na absorbância dos dois corantes.

**Tabela 13** - Eficiência de encapsulação dos corantes SR 101 e 6-Coumarin em nanopartículas lipídicas.

Amostra	Corante	EE (%)
NP-Ácido esteárico	SR-101	63
NP-Ácido esteárico+crodamol (50/50)	SR-101	28
NP-Ácido esteárico+crodamol (50/50)	Coumarin-6	95

### 5.3 CONCLUSÕES

Nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico biocompatíveis e biodegradáveis com diâmetro médio variando entre 270 e 550 nm foram preparadas através da técnica de fusão/dupla emulsão sem o uso de solventes orgânicos. O tamanho médio de partícula e a dispersão foram influenciados, principalmente, pela quantidade de lipídio e surfactante utilizados. As dispersões com as menores partículas (277 nm) foram obtidas quando uma mistura dos surfactantes lecitina e Tween 80 foi utilizada. Esta combinação resultou, também, em miniemulsões bastante estáveis, as quais não apresentaram aumento significativo do tamanho de partícula, agregação ou sedimentação ao longo de 60 dias de estocagem. A adaptação da técnica utilizada, que foi previamente proposta para preparação de micropartículas lipídicas sólidas, mostrou-se bastante eficaz para encapsulação de ambos compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, com eficiência de encapsulação maior do que 60% e 95% para os compostos hidrófilos e hidrófobos, respectivamente. A cristalização do ácido esteárico foi parcialmente inibida através da adição de crodamol na preparação de nanopartículas lipídicas blenda de ácido esteárico/crodamol. No entanto, a adição de crodamol resultou numa concomitante redução da eficiência de encapsulação do composto hidrofílico. As nanopartículas desenvolvidas neste trabalho apresentam um elevado potencial de aplicação como sistemas carreadores de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos nas áreas farmacêutica e de alimentos.

## CAPÍTULO VI

### 6 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, foram apresentados sistemas nanoparticulados carreadores de fármaco promissores para liberação prolongada. Os resultados aqui discutidos, os quais foram divididos em três capítulos independentes, envolvem a síntese de novos polímeros derivados de *L*-lisina e *L*-ácido glutâmico, aminoácidos essenciais e não-essenciais produzidos a partir de fontes renováveis, respectivamente, bem como o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas através de uma adaptação da técnica de dupla emulsão que dispensa a utilização de solventes orgânicos.

Ainda pouco explorados, os polímeros à base de aminoácidos mostram-se bastante versáteis e atrativos para uma variedade de aplicações na área biomédica e farmacêutica em virtude da sua biocompatibilidade e degradabilidade intrínsecas. O polímero derivado de *L*-lisina (poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster)), sintetizado via ALTMET, é amorfo, macio e de aspecto pegajoso à temperatura ambiente. Dependendo das condições reacionais, polímeros de massa molar variando entre 2600 a 18000 g/gmol podem ser obtidos. De caráter hidrofóbico, este polímero é indicado principalmente para a encapsulação de compostos hidrofóbicos. As nanopartículas de poli(bisacrilamida-*L*-lisina-*co*-fenil-fosfodiéster) (50 – 80 nm) foram eficientemente carregadas com rifampicina (fármaco hidrofóbico), as quais apresentaram eficiência de encapsulação superior a 94% e teor de fármaco de até 50% em base mássica. São sugeridos, como trabalhos futuros, que os mecanismos de liberação do fármaco sejam avaliados. A biocompatibilidade e degradabilidade do polímero e das nanopartículas também devem ser investigadas.

Os polímeros derivados de *L*-ácido glutâmico (poli(acrilamida-*L*-ácido glutâmico)), por outro lado, são hidrofílicos. As reações de polimerização por radicais livres do monômero *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico levam à formação de hidrogéis fisicamente reticulados por ligações de hidrogênio. Dependendo das condições reacionais, no entanto, polímeros completamente hidrossolúveis podem também ser obtidos. Adicionalmente, hidrogéis quimicamente reticulados podem ser obtidos a partir da copolimerização dos monômeros *N*-acrilamida-*L*-ácido glutâmico e *N,N'*-metilenobis(acrilamida). Em virtude do caráter

hidrofílico, os hidrogéis são indicados principalmente para a encapsulação de compostos hidrofílicos. Nanogéis de poli(acrilamida-*L*-ácido glutâmico) (270 – 370 nm), os quais se mostraram biocompatíveis na presença de células HeLa e L929, apresentaram grande capacidade de encapsulação de doxorrubicina. Eficiência de encapsulação superior a 80% e teor de fármaco de até 4%, em base mássica, foram obtidos. São sugeridos, como trabalhos futuros, a encapsulação de fármacos hidrofílicos pós-síntese dos nanogéis (por mecanismos de adsorção), bem como a avaliação da liberação do fármaco *in vitro* sob diferentes condições de pH. A degradabilidade do polímero e das nanopartículas também deve ser investigada.

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), por sua vez, são geralmente atóxicas e biodegradáveis, uma vez que são, preferencialmente, preparadas por lipídios naturais de origem animal ou vegetal. A adaptação da técnica de fusão/dupla emulsão livre de solventes orgânicos proposta mostrou-se bastante eficiente na preparação de partículas de tamanho submicrométrico. Observou-se que o tamanho das nanopartículas pode ser facilmente controlado através da concentração e tipo de surfactante e lipídio. As NLS desenvolvidas neste trabalho apresentam potencial aplicabilidade para encapsulação simultânea de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, tendo sido obtida eficiência de encapsulação maior do que 60% e 95% para os compostos hidrófilos e hidrófobos, respectivamente. Para trabalhos futuros, é sugerido investigar se a técnica de fusão/dupla emulsão pode ser estendida a outros sistemas de NLS (diferentes lipídios e fármacos). É também necessário entender o mecanismo de liberação de fármaco e a toxicidade do sistema.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; SLUGOVIC, C. As low as reasonably achievable catalyst loadings in the cross metathesis of olefins with ethyl acrylate. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 20, p. 2560–2562, 2011.
- ADJIMAN, C. S. et al. Solvents for ring-closing metathesis reactions. **Chemical Communications**, n. 24, p. 2806, 2008.
- ALEXANDRINO, E. M. et al. Paclitaxel-loaded polyphosphate nanoparticles: a potential strategy for bone cancer treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 10, p. 1298, 2014.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818–22, 2004.
- ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 478–90, 2007.
- ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689–757, 2002.
- ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, set. 2002.
- ATALLAH, P.; WAGENER, K. B.; SCHULZ, M. D. ADMET: The future revealed. **Macromolecules**, v. 46, n. 12, p. 4735–4741, 2013.
- BAIER, G. et al. Cross-linked starch capsules containing dsDNA prepared in inverse miniemulsion as “nanoreactors” for polymerase chain reaction. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 960–8, 2010.
- BAJAJ, I.; SINGHAL, R. Bioresource Technology Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5551–5561, 2011.
- BAUGHMAN, T. W.; WAGENER, K. B. Recent Advances in ADMET Polymerization. In: BUCHMEISER, M. R. (Ed.). . **Metathesis Polymerization**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. v. 176p. 1–42.
- BENICHO, A; ASERIN, A; GARTI, N. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active

matters. **Advances in colloid and interface science**, v. 108-109, p. 29–41, 20 maio 2004.

BERNARDY, N. et al. Nanoencapsulation of Quercetin via Miniemulsion Polymerization. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 181–186, 2010.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method. **Pharmaceutical development and technology**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2003.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 4, p. E594–604, 2005.

BODMEIER, R.; WANG, J.; BHAGWATWAR, H. Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. II. W/O/W multiple emulsion technique for water-soluble drugs. **Journal of microencapsulation**, v. 9, n. 1, p. 99–107, 1992.

BRITO, C. W. D. Q. et al. Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de Copolímeros acrilamida-acrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 40–45, 2013.

BROWN, B.; BRANNON-PEPPAS, L. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation : preparation , characterization and in vitro evaluation. **Future medicine**, v. 2, n. 2, p. 219–232, 2007.

BUMMER, P. M. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery--solid lipid nanoparticles. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2004.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal of pharmaceutical science**, v. 85, n. 5, p. 530–536, 1996.

CAO, Z. et al. Synthesis of narrowly size-distributed metal salt/poly(HEMA) hybrid particles in inverse miniemulsion: versatility and mechanism. **Langmuir**, v. 26, n. 23, p. 18008–15, 2010.

- CAO, Z.; ZIENER, U.; LANDFESTER, K. Synthesis of Narrowly Size-Distributed Thermosensitive Poly (N -isopropylacrylamide) Nanocapsules in Inverse Miniemulsion. **Macromolecules**, v. 43, n. 15, p. 6353–6360, 2010.
- CAPEK, I. On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. **Advances in colloid and interface science**, v. 156, n. 1-2, p. 35–61, 2010.
- CARDOSO, P. B. et al. ADMET reactions in miniemulsion. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 1300–1305, 2014.
- CARDOSO, P. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of Jojoba and Andiroba Oils by Miniemulsion Polymerization. Effect on Molar Mass Distribution. **Macromolecular Symposia**, v. 324, n. 1, p. 114–123, 2013.
- CHATTERJEE, A. K. et al. A general model for selectivity in olefin cross metathesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 37, p. 11360–11370, 2003.
- CHELLAT, F. et al. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7260–7275, 2005.
- CHOI, T.-L.; RUTENBERG, I. M.; GRUBBS, R. H. Synthesis of A,B-alternating copolymers by ring-opening-insertion-metathesis polymerization. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 41, n. 20, p. 3839–3841, 2002.
- COUVREUR, P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 21–3, 2013.
- CRESPY, D. et al. Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets. **Macromolecules**, v. 40, n. 9, p. 3122–3135, 2007.
- DEMEL, S. et al. Alternating diene metathesis polycondensation (ALTMET) - A versatile tool for the preparation of perfectly alternating AB copolymers. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 24, n. 10, p. 636–641, 2003.
- FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. March, p. 161–171, 2005.

FOKOU, P. A.; MEIER, M. A. R. Studying and Suppressing Olefin Isomerization Side Reactions During ADMET Polymerizations. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 31, n. 4, p. 368–373, 2010.

FRAUNHOFER, W. et al. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Light Scattering for Analysis of Gelatin Nanoparticle Drug Carrier Systems. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 7, p. 1909–1920, 2004.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of controlled release**, v. 102, n. 2, p. 313–332, 2 fev. 2005.

FÜHRER, F. N.; SCHLAAD, H. ADMET Polymerization of Amino-Acid-Based Diene. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 215, p. 2268–2273, 2014.

FÜRSTNER, A. Olefin Metathesis and Beyond. **Angewandte Chemie**, v. 39, n. 17, p. 3012–3043, 2000.

GARCÍA-FUENTES, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, p. 159–168, 2002.

GONZALES, D.; FAN, K.; SEVOIAN, M. Synthesis and Swelling Characterizations of a poly (gamma-glutamic acid) Hydrogel. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 34, n. 10, p. 2019–2027, 1996.

GRUBBS, R. H.; CHANG, S. Recent advances in olefin metathesis and its application in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 54, n. 18, p. 4413–4450, 1998.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug di**, v. 7, n. 10, p. 569–579, 2002.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–49, 14 dez. 2008.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 210–216, fev. 2008.

HECHT, L. L. et al. Miniemulsions for the Production of Nanostructured Particles. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 9, p. 1670–1676, 2012.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymers**, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 3–12, jan. 2002.

HOPKINS, T. E. et al. Chiral polyolefins bearing amino acids. **Macromolecules**, v. 34, n. 23, p. 7920–7922, 2001.

HOPKINS, T. E.; WAGENER, K. B. Amino acid and dipeptide functionalized polyolefins. **Macromolecules**, v. 36, n. 7, p. 2206–2214, 2003.

HOPKINS, T. E.; WAGENER, K. B. ADMET Synthesis of Polyolefins Targeted for Biological Applications. **Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 1180–1189, 2004.

HU, F.-Q. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3-4, p. 167–73, 2005.

HUANG, X.; SUDOL, E.; DIMONIE, V. Stability in styrene/HD miniemulsions containing a RAFT agent. **Macromolecules**, v. 39, p. 6944–6950, 2006.

IZUMIKAWA, S. et al. Preparation of poly (L-lactide ) microspheres of different crystalline morphohology and effect of crystalline morphology on drug release rate. **Journal of Controlled Release**, v. 15, p. 133–140, 1991.

JERSCHOW, A.; MÜLLER, N. Suppression of Convection Artifacts in Stimulated-Echo Diffusion Experiments. Double-Stimulated-Echo Experiments. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 375, n. 125, p. 372–375, 1997.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231–236, 2000.

KALARIA, D. R. et al. Design of Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Doxorubicin: In vivo Pharmacokinetics and Toxicity Studies in Rats. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 3, p. 492–501, 2009.

KAMMEYER, J. K. et al. Polymerization of Protecting-Group-Free Peptides via ROMP. **Polymer chemistry**, v. 41, n. 14, p. 3929–3933, 2013.

KHERADMANDNIA, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 6, n. 6, p. 753–759, 2010.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2392–9, 2009.

KLINGER, D.; LANDFESTER, K. Dual Stimuli-Responsive Poly (2-hydroxyethyl methacrylate- co -methacrylic acid) Microgels Based on Photo-Cleavable Cross-Linkers: pH-Dependent Swelling and Light-Induced Degradation. p. 9758–9772, 2011.

KLINGER, D.; LANDFESTER, K. Stimuli-responsive microgels for the loading and release of functional compounds: Fundamental concepts and applications. **Polymer**, v. 53, n. 23, p. 5209–5231, 2012.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.

KUMAR, N. A. et al. Novel amino-acid-based polymer/multi-walled carbon nanotube bio-nanocomposites: highly water dispersible carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 20, n. 22, p. 225608, 2009.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1842–1852, 2013.

- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- KURATA, K.; DOBASHI, A. Novel Temperature- and pH-Responsive Linear Polymers and Crosslinked Hydrogels Comprised of Acidic L - $\alpha$ -Amino Acid Derivatives. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 41, n. 2, p. 143–164, 29 dez. 2004.
- KWON, H.-Y. et al. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 182, n. 1-3, p. 123–130, 2001.
- LANDFESTER, K. et al. Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. **Macromolecules**, v. 32, n. 16, p. 5222–5228, 1999.
- LANDFESTER, K. Quantitative considerations for the formulation of miniemulsions. In: DÉKÁNY, I. (Ed.). . **Adsorption and Nanostructure - Progress in Colloid and Polymer Science**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 101–103.
- LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 231–279, 2006.
- LANDFESTER, K.; WEISS, C. Encapsulation by Miniemulsion Polymerization. In: CARUSO, F. (Ed.). . **Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions**. Advances in Polymer Science. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 229, p. 1–49.
- LANDFESTER, K.; WILLERT, M.; ANTONIETTI, M. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. **Macromolecules**, v. 33, n. 7, p. 2370–2376, 2000.
- LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. **Macromolecular bioscience**, v. 7, n. 6, p. 767–783, 2007.
- LAWRIE, A. S. et al. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. **Vox Sanguinis**, v. 96, n. 3, p. 206–212, 2009.
- LEE, H.-K. et al. Multiple Olefin Metathesis Polymerization That Combines All Three Olefin Metathesis Transformations: Ring-Opening, Ring-Closing, and Cross Metathesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 29, p. 9262–9265, 2015.

LEE, J. C.; PARKER, K. A.; SAMPSON, N. S. Amino acid-bearing ROMP polymers with a stereoregular backbone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 14, p. 4578–4579, 2006.

LI, C. Poly (L-glutamic acid) – anticancer drug conjugates. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 5, p. 695–713, 2002.

LIM, S.; KIM, C. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **International journal of pharmaceutics**, v. 243, p. 135–146, 2002.

LIU, J. et al. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 693–710, 2014.

LUO, Y.; ZHOU, X. Nanoencapsulation of a hydrophobic compound by a miniemulsion polymerization process. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, p. 2145–2154, 2004.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International journal of pharmaceutics**, v. 290, n. 1-2, p. 137–44, 16 fev. 2005.

MALZAHN, K. et al. Selective interfacial olefin cross metathesis for the preparation of hollow nanocapsules. **ACS Macro Letters**, v. 3, n. 1, p. 40–43, 2014.

MARSICO, F. et al. Unsaturated polyphosphoesters via acyclic diene metathesis polymerization. **Macromolecules**, v. 45, n. 21, p. 8511–8518, 2012.

MAYNARD, H. D.; OKADA, S. Y.; GRUBBS, R. H. Synthesis of Norbornenyl Polymers with Bioactive Oligopeptides by Ring-Opening Metathesis Polymerization. **Macromolecules**, v. 33, n. 17, p. 6239–6248, 2000.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165–96, 2001.

MEIER, M. A R. Metathesis with Oleochemicals: New approaches for the utilization of plant oils as renewable resources in polymer science. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, n. 13-14, p. 1073–1079, 2009.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 185–229, 2004.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; HINRICHSEN, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 276-277, n. 1, p. 1–24, 2000.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113–42, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. **Advances in colloid and interface science**, v. 163, n. 2, p. 90–122, 2011.

MOREL, S. et al. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 132, p. 259–261, 1996.

MS, M. DA S. **Guia de vigilância em saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/27/guia-vigilancia-saude-linkado-27-11-14.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–77, 2000.

MUSYANOVYCH, A. et al. Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. **Macromolecular bioscience**, v. 8, n. 2, p. 127–39, 2008.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762–798, ago. 2007.

NAM, K. W.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Characterization of the Spontaneously Forming Hydrogels Composed of Water-Soluble Phospholipid Polymers. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 1, p. 100–105, jan. 2002.

NAWARA, K.; KRYSINSKI, P.; BLANCHARD, G. J. Photoinduced Reactivity of Doxorubicin: Catalysis and Degradation. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 116, n. 17, p. 4330–4337, 2012.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced drug delivery reviews**, v. 28, n. 1, p. 25–42, 1997.

OH, J. K. et al. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 4, p. 448–477, 2008.

OLIVEIRA, M. A. M. et al. In Situ Incorporation of Doxorubicin in Copolymer Particles During Suspension Polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 23–33, 2012.

OPPER, K. L. et al. ADMET : Metathesis Polycondensation. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 821–831, 2011.

PAL, R. Rheology of double emulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 307, n. 2, p. 509–15, 2007.

PALIWAL, R. et al. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 5, n. 2, p. 184–91, 2009.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 85, n. 4, p. 227–34, jul. 2005.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329–347, 2003.

PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 146–61, 2005.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–66, 2012.

PECORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, n. 2, p. 123–131, 2000.

PEPPAS, N. A.; KHARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced drug delivery reviews**, v. 11, n. 1-2, p. 1–35, 1993.

PERES, L. B. **Obtenção de nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS para incorporação de um análogo da isoniazida.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

PERES, L. B. et al. Preparation of PLLA/PMMA and PLLA/PS binary blend nanoparticles by incorporation of PLLA in methyl methacrylate or styrene miniemulsion homopolymerization. **Polímeros**, v. 25, n. 1, p. 23–28, 2015.

PERES, L. B. et al. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 317–323, 2016.

PEZZINI, B. R. et al. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491–502, 2007.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 447–451, 2001.

PREISS, L. C. et al. Amino-Acid-Based Chiral Nanoparticles for Enantioselective Crystallization. **Advanced Materials**, v. 27, n. 17, p. 2728–2732, 2015.

QIAO, Z.-Y. et al. Multi-responsive nanogels containing motifs of ortho ester, oligo(ethylene glycol) and disulfide linkage as carriers of hydrophobic anti-cancer drugs. **Journal of controlled release**, v. 152, n. 1, p. 57–66, 30 maio 2011.

QIU, J.-J. et al. Synthesis of unsaturated polyphosphoester as a potential injectable tissue engineering scaffold materials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 4, p. 3095–3101, 2006.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 49–60, 2012.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 5173, n. 96, p. 133–141, 1996.

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GÖPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 339–350, 2001.

ROMERA, C. DE O. et al. Acyclic triene metathesis (ATMET) miniemulsion polymerization of linseed oil produces polymer nanoparticles with comparable molecular weight to that of bulk reactions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 2, p. 235–241, 2015.

ROMIO, A. P. et al. Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, n. 9, p. 747–751, 2009.

ROMIO, A. P. et al. Encapsulation of magnetic nickel nanoparticles via inverse miniemulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 3, p. 1426–1433, 2013.

SAFRA, T. et al. Original article patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg / m<sup>2</sup>. **Annals of Oncology**, v. 11, n. 8, p. 1029–1033, 2000.

SANKARANARAYANAN, J. et al. Multiresponse Strategies To Modulate Burst Degradation and Release from Nanoparticles. **ACS Macro Letters**, v. 4, n. 10, p. 5930–5936, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHLAAD, H. et al. Synthesis of  $\alpha,\omega$ -Heterobifunctional Poly(ethylene glycol)s by Metal-Free Anionic Ring-Opening Polymerization. **Macromolecules**, v. 34, n. 13, p. 4302–4304, 2001.

SCHMALJOHANN, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery ☆. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1655–1670, 2006.

SCHMIDTS, T. et al. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 338, n. 1, p. 184–192, 2009.

SCHORK, F. J. et al. Miniemulsion polymerization. In: MASAYOSHI OKUBO (Ed.). **Polymer Particles**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2005. v. 175, p. 129–255.

SCHULZ, M. D.; WAGENER, K. B. Solvent Effects in Alternating ADMET Polymerization. **ACS Macro Letters**, v. 1, n. 4, p. 449–451, 2012.

SEVERINO, P. et al. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125–130, 1 ago. 2011.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 761–766, 2004.

SIGMA-ALDRICH. **Rifampicin, product information**. Disponível em: <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/r3501pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r3501pis.pdf)>. Acesso em: 21 abr. 2016.

SINGH, H.; BHANDARI, R.; KAUR, I. P. Encapsulation of Rifampicin in a solid lipid nanoparticulate system to limit its degradation and interaction with Isoniazid at acidic pH. **International journal of pharmaceutics**, v. 446, n. 1-2, p. 106–111, 25 mar. 2013.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 2001.

SOTO-CANTU, E. et al. Synthesis and Rapid Characterization of Amine-Functionalized Silica. **Langmuir**, v. 28, n. 13, p. 5562–5569, 2012.

SOUSA-HERVES, A.; WEDEPOHL, S.; CALDERO, M. ChemComm hyperbranched polyglycerol †. **Chemical Communications**, n. Scheme 1, p. 5264–5267, 2015.

SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762–1769, 2011.

SOUZA, A. A. DE; LAVERDE JR., A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1022–1026, 2002.

STAUDT, T. et al. Magnetic Polymer/Nickel Hybrid Nanoparticles Via Miniemulsion Polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 214, n. 19, p. 2213–2222, 2013.

STEINMACHER, F. R. et al. Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core. **Chemical Engineering & Technology**, v. 33, n. 11, p. 1877–1887, 2010.

STEINMACHER, F. R. et al. **Encapsulation of hydrophilic compound in aqueous-core nanocapsules by inverse miniemulsion** 12<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Polímeris. **Anais...**2013

STEJSKAL, E. O.; TANNER, J. E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. **The Journal of Chemical Physics**, v. 42, n. 1, p. 288–292, 1965.

SUTTHASUPA, S. et al. Ring-opening metathesis polymerization of amino acid-functionalized norbornene diester monomers. **Polymer**, v. 48, n. 11, p. 3026–3032, 2007.

TERADA, K. et al. ADMET polycondensation of diketopiperazine-based dienes. Polymerization behavior and effect of diketopiperazine on the properties of the formed polymers. **Macromolecules**, v. 41, n. 16, p. 6041–6046, 2008.

TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization. **Langmuir**, v. 17, n. 3, p. 908–918, 2001.

TSCHAN, M. J. et al. Synthesis of biodegradable polymers from renewable resources. **Polymer Chemistry**, v. 3, p. 836–851, 2012.

UBRICH, N. et al. Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. **Journal of controlled release**, v. 97, n. 2, p. 291–300, 2004.

UCHIZONO, J. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the design of controlled delivery systems. In: LI, X.; JASTI, B. R. (Eds.). **Design of controlled release drug delivery systems, ...** New York: McGraw-Hill Professional, 2005. p. 435.

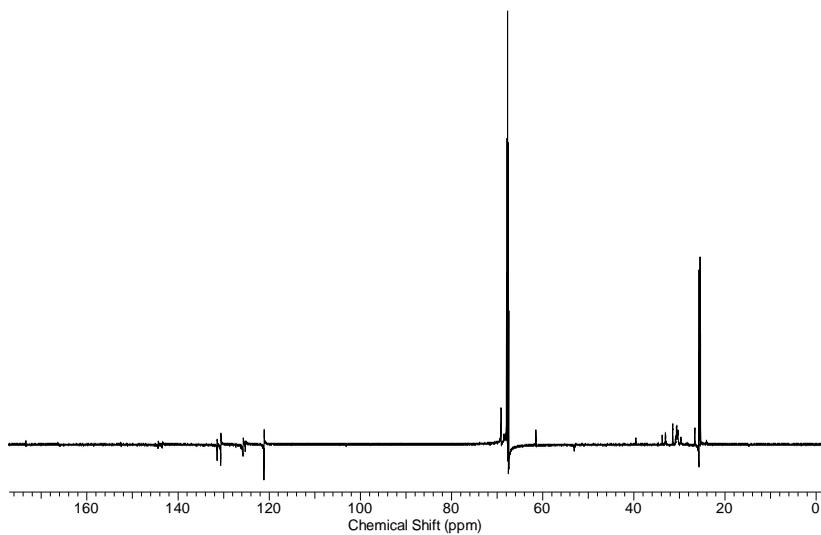
ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

- VALÉRIO, A.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Preparation of Poly (Urethane-urea) Nanoparticles Containing Açai Oil by Miniemulsion Polymerization. **Polímeros**, v. 23, n. 4, p. 451–455, 2013.
- VARSHOSAZ, J.; MINAYIAN, M.; MOAZEN, E. Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. **Journal of liposome research**, v. 20, n. 2, p. 115–123, 2010.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.
- VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593–8604, 2011.
- WAGENER, K. B. et al. Acyclic diene metathesis copolymerization of 1,5-hexadiene and 1,9-decadiene. **Macromolecules**, v. 23, n. 24, p. 5155–5157, 1990.
- WANG, Y. C. et al. Recent progress in polyphosphoesters: From controlled synthesis to biomedical applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 12, p. 1154–1164, 2009.
- WHO, W. H. O. **Global Tuberculosis Report 2015**. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf)>.
- WU, W. et al. Synthesis of amino acid-containing polyacids and their application in self-cured glass-ionomer cement. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 5, p. 959–968, maio 2003.
- XIE, D. et al. Novel amino acid-constructed polyalkenoates for dental glass-ionomer restoratives. **Journal of biomaterials applications**, v. 21, n. 2, p. 147–165, 2006.
- ZHANG, N. et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **International journal of pharmaceuticals**, v. 327, n. 1-2, p. 153–159, 2006.
- ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 104–120, 2013.



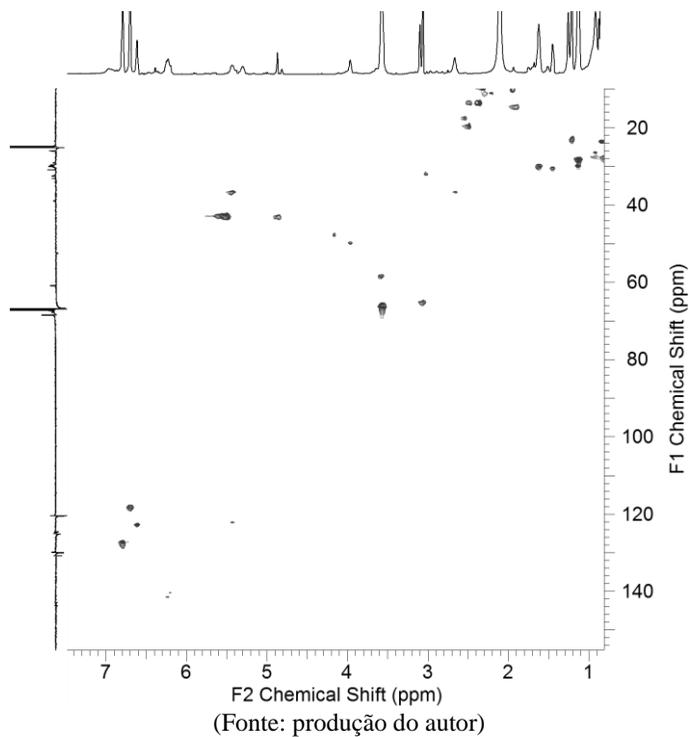
## APÊNDICE – Espectros RMN das Reações ALTMET

**Figura A1:** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (700 MHz) do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) em  $\text{THF-d}_8$ .

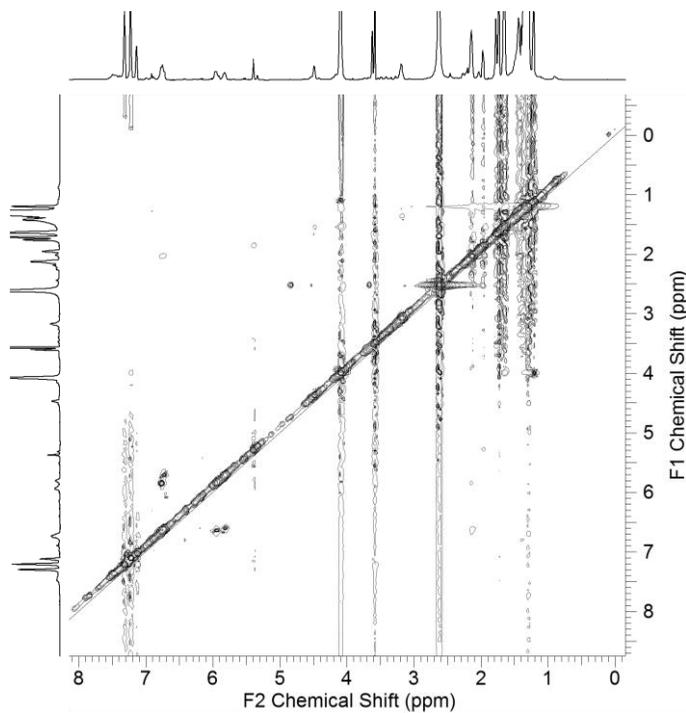


(Fonte: produção do autor)

**Figura A2:** Espectro HSQC-RMN (700 MHz) do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .



**Figura A3:** Espectro NOESY-RMN (700 MHz) do copolímero poli(bisacrilamida-*L*-lisina-co-fenil-fosfodiéster) em THF- $d_8$ .



(Fonte: produção do autor)