

Rodolfo Debone Piazza

**“CLICK HIDROGÉIS DE GELATINA E NANOPARTÍCULA
POLIMÉRICA COMO PLATAFORMA DE LIBERAÇÃO
SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS HIDROFÍLICO E HIDROFÓBICO”**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Química.

Orientador: Profº Dr. Miguel Jafelicci Junior.

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

P584c Piazza, Rodolfo Debone
Click hidrogéis de gelatina e nanopartícula polimérica
como plataforma de liberação de simultânea de fármacos
hidrofílico e hidrofóbico / Rodolfo Debone Piazza. –
Araraquara : [s.n.], 2018
120 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Miguel Jafelicci Junior

1. Gelatina. 2. Tecnologia de liberação controlada.
3. Nanopartículas. 4. Diclofenaco. 5. Metotrexato. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Click Hidrogéis de gelatina e nanopartícula polimérica como plataforma de liberação simultânea de fármacos Hidrofílico e Hidrofóbico"

AUTOR: RODOLFO DEBONE PIAZZA


ORIENTADOR: MIGUEL JAFELICCI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MIGUEL JAFELICCI JUNIOR
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. SANDRA HELENA PULCINELLI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro


Prof. Dr. DENISE FREITAS SIQUEIRA PETRI
Departamento de Química Fundamental / Instituto de Química- USP -São Paulo


Prof. Dr. WENDEL ANDRADE ALVES
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Araraquara, 20 de abril de 2018

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Rodolfo Debone Piazza

Filiação: Rubens Piazza e Marialice Debone Piazza

Nascimento: 17/12/1987 - Santo André/SP - Brasil

Carteira de Identidade: 42481019-0 ssp - SP - 01/04/2005

CPF: 358.731.738-00

Endereço profissional:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Instituto de Química de Araraquara

Jardim Quitandinha – Araraquara, SP - Brasil

CEP 14800-060

Endereço eletrônico: rodolfo.piazza@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2012 - 2014 Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Título: Modificação de superfície de óxidos de ferro por dextrana derivatizada para aplicação em liberação de fármacos, Ano de obtenção: 2014

Orientador: Miguel Jafelicci Junior

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2008 - 2011 Graduação em Bacharelado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Título: Modificação de nanopartículas de óxido de ferro por dextranas

Orientador: Miguel Jafelicci Junior

Formação complementar

2013 – 2013 Curso de curta duração em Biopolímeros e sistemas nanoestruturados. (Carga horária: 30h). Instituto de Química São Carlos - USP, IQSC-USP, Brasil

Áreas de atuação

1. Química
2. Físico-Química
3. Química de Interfaces
4. Biomateriais e Materiais Biocompatíveis

Idiomas

Inglês: Compreende razoavelmente, fala razoavelmente, escreve razoavelmente, lê razoavelmente.

Espanhol: Compreende razoavelmente, lê razoavelmente.

Prêmios e títulos

2012 Prêmio Lavosier, Conselho Regional de Química - IV Região

Artigos completos publicados em periódicos

1. **PIAZZA, RODOLFO DEBONE;** DA SILVA NUNES, ELOIZA; VIALI, WESLEY RENATO; DA SILVA, SEBASTIÃO WILLIAM; ARAGÓN, FERMIN HERRERA; COAQUIRA, JOSÉ ANTÔNIO HUAMANÍ; DE MORAIS, PAULO CÉSAR; MARQUES, RODRIGO FERNANDO COSTA; JAFELICCI, MIGUEL. Magnetic nanohydrogel obtained by miniemulsion polymerization of poly(acrylic acid) grafted onto derivatized dextran. CARBOHYDRATE POLYMERS, v.178, p.378 - 385, 2017.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PIAZZA, R. D.; BRANDT, J. V.; KITAMURA, S. H. P.; MAGALHAES, V. A. V.; MARQUES, R. C.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Mechanism and kinetics of methotrexate release from mpeg-co-pcl nanoparticles** In: 46^o World Chemistry Congress and 40^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2017, São Paulo.
2. SANTOS, C. C.; CRUZ, A. C.; PIAZZA, R. D.; AMANTEA, B. E.; MARQUES, R. C.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Poly(vinylidene fluoride) nanoparticles with SPIONS synthesized by miniemulsion method** In: 7th Latinamerican conference on metastable and nanostructured materials, 2017, Brotas.
4. Costa, T. P.; PIAZZA, R. D.; ROCHA, C. O.; JAFELICCI JUNIOR, M.; MARQUES, R. C. **Porous hydroxiapatite scaffolds surface modified with pluronics for alendronate delivery** In: Fifth international conference on multifunctiona, hybrid and nanomaterials, 2017, Lisboa. Portugal
5. PIAZZA, R. D.; BRANDT, J. V.; KITAMURA, S. H. P.; MAGALHAES, V. A. V.; MARQUES, R. C.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Synthesis of mPEG-co-PCL nanoparticles for controlled methotrexate delivery** In: Fifth International conference on multifunctional, hybrid and nanomaterials, 2017, Lisboa, Portugal.
6. BRIANEZI, S. S. F.; CASTRO, K. C.; MELO, M. S. F.; PEREIRA, R. M.; PIAZZA, R. D.; MARQUES, R. C.; CAMPOS, M. G. N. **Membranas de quitosana e mPEG-PCL para recobrimento de feridas e liberação controlada de gentamicina** In: 22^o Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Natal, RN.
7. PIAZZA, R. D.; BRANDT, J. V.; MARQUES, R. C.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Nanohidrogel de gelatina: reticulação via reações de Diels - Alder** In: 39^a reunião anual da sociedade brasileira de química, 2016, Goiânia.
8. PAIVA, J. M.; PIAZZA, R. D.; JAFELICCI JUNIOR, M.; MARQUES, R. C. **Homogeneous coprecipitation through urea solid decomposition for magnetic nanoparticles synthesis** In: Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015, Sitges, Espanha.
9. PIAZZA, R. D.; NUNES, E. S.; MARQUES, R. C.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Magnetic nanohydrogels γ -Fe₂O₃@dextran for doxorubicin drug delivery** In: Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015, Sitges, Espanha.

10. PIAZZA, R. D.; NUNES, E. S.; MARQUES, R. C.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Magnetic hydrogels Fe₂O₃@Dextran for drug delivery** In: XIII Brazilian Materials Research Society, 2014, João Pessoa - PB.
11. PIAZZA, R. D.; NUNES, E. S.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Polimerização de hidrogéis magnéticos γ Fe₂O₃@Dextrana via miniemulsão inversa.** In: 37^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal.
12. PIAZZA, R. D.; NUNES, E. S.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Iron oxide nanoparticles functionalized with PAA-co-Dextran using inverse miniemulsion** In: XII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2013, Campos do Jordão, SP.
13. PIAZZA, R. D.; JAFELICCI JUNIOR, M. **Nanopartícula magnética de óxido de ferro encapsulada com ácido poliacrílico** In: 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia, SP.

Agradecimentos

Aos meus pais, Marialice e Rubens, por todo o apoio durante o ciclo de estudos na pós-graduação. Em especial a paciência durante a reta final. Obrigado;

À minha irmã, Ligia, que continua me fazendo rir;

Aos meus avós, que ainda não compreenderam que ciência é profissão. *In memoriam*: “Bom dia senhor bacharel, mestre e quase doutor Rodolfo”. Após a homologação desta tese, a frase seria dita sem o ‘quase’, mas com o mesmo carinho;

Ao Prof^o Miguel Jafelicci Junior pela orientação neste trabalho. Não apenas pelas discussões científicas, mas principalmente pelas filosóficas e culturais;

Ao Prof^o Rodrigo Marques, pela amizade e pelo rock in roll.

Aos amigos do Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides, pelas discussões, incentivos e momentos de descontração;

Aos alunos de iniciação científica que tive o prazer de supervisionar, ensinar e aprender: Robert Nißler, Stephany Kitamura e João Victor Brandt.

Aos amigos do Laboratório de Materiais Fotônicos, pela constante troca de reagentes;

Aos técnicos, servidores e laboratórios do IQ Unesp/CAr que colaboraram com o desenvolvimento do presente trabalho, em especial ao GQM, plataforma de RMN, Apoio técnico e LMA do IQ.

Aos companheiros e companheiras que tive o privilégio de dividir o mesmo teto, o mesmo prato e o mesmo copo ao longo destes últimos anos. A vida é leve e mais divertida com a presença de vocês.

À CAPES pela bolsa concedida.

Por último, vocês me ensinam que esse universo prestigioso e colorido se reduz ao átomo e que o próprio átomo se reduz ao elétron. Tudo isso é bom e espero que vocês continuem. Mas vocês me falam de um invisível sistema planetário em que os elétrons gravitam ao redor de um núcleo. Vocês me explicam esse mundo com uma imagem. Reconheço, então, que vocês enveredam pela poesia: nunca chegarei ao conhecimento. Tenho tempo para me indignar com isso? Vocês já mudaram de teoria. Assim, essa ciência que devia me ensinar tudo se limita à hipótese, essa lucidez se perde na metáfora, essa certeza se resolve como obra de arte. Para o que é que eu precisava de tantos esforços?

O mito de Sísifo. Albert Camus. 1942.

RESUMO

Nas últimas décadas as plataformas para liberação controlada de fármacos têm sido estudadas pela comunidade científica para o desenvolvimento de materiais aplicados à biomedicina, principalmente para o tratamento de câncer. Estruturas como nanopartículas poliméricas, micelas, lipossomas, hidrogéis, dendrímeros, entre outras, foram modificadas para que suas propriedades físico-químicas apresentassem compatibilidade com o meio biológico de interesse para liberação de moléculas bioativas. Recentemente a combinação de terapias utilizando fármacos com diferente ação terapêutica tem se tornando uma alternativa efetiva para o tratamento de doenças e regeneração de tecidos, sendo necessário que as propriedades das plataformas de liberação sejam ajustadas para controlar a liberação de dois ou mais fármacos. O presente trabalho consiste no desenvolvimento de uma plataforma de liberação simultânea de diclofenaco de potássio e metotrexato, fármacos que apresentam hidrofobicidade distinta. Assim, hidrogéis à base de gelatina e dextrana foram obtidos como plataforma de liberação de diclofenaco e metotrexato incorporado à nanopartículas de mPEG-co-PCL. O hidrogel foi reticulado a partir de reações click, nos quais as estruturas poliméricas da gelatina e dextrana foram modificadas com anidrido maleico e ácido furóico, respectivamente. Estes reagentes contêm grupos dieno e dienófilo que permitem a formação de ligações covalentes através das reações click de Diels – Alder. O intumescimento do hidrogel e a liberação de diclofenaco de potássio foram estudados em diversos meios de dissolução. Foi possível observar que o aumento da capacidade de intumescimento resultou em liberações mais rápidas de diclofenaco. Foi possível obter copolímero de mPEG-co-PCL a partir da polimerização por abertura de anel do monômero de ε-caprolactona, cujo método permitiu controlar o tamanho do segmento hidrofóbico da cadeia polimérica. Com os copolímeros sintetizados, nanopartículas poliméricas contendo metotrexato foram obtidas pelo método da emulsão/evaporação por solvente. A eficiência de incorporação do metotrexato foi superior a 80%, enquanto a liberação se mostrou dependente do tamanho de cadeia do copolímero: o aumento do segmento hidrofóbico da cadeia reduz a fração de metotrexato liberado, sendo dependente da lenta biodegradação da cadeia de PCL pelo organismo. Quando as nanopartículas de mPEG-co-PCL foram incorporadas ao hidrogel de gelatina para avaliação da liberação simultânea de diclofenaco de potássio e metotrexato foi observado que o fármaco hidrofílico apresentou rápida liberação da matriz de hidrogel, enquanto o fármaco hidrofóbico teve um comportamento de liberação sustentado devido a degradação do segmento hidrofóbico.

Palavras chave: Click hidrogel, sistemas de liberação simultâneo de fármaco, Nanopartícula polimérica, diclofenaco de potássio, metotrexato,

ABSTRACT

In recent decades, platforms for drugs delivery have been studied by the scientific community for the development of materials applied to biomedicine, mainly for the cancer treatment. Structures such as polymeric nanoparticles, micelles, liposomes, hydrogels, dendrimers, among others, were modified to adjust their physicochemical properties to show compatibility with the biological milieu of interest for the release of bioactive molecules. Recently, the combination of drugs with different therapeutic actions has become an effective alternative for the treatment of diseases and tissue regeneration, however further adjustment of properties is required to control the release of two or more drugs. The present work consists in the development of a dual drug delivery platform to release potassium diclofenac and methotrexate, drugs that presented different hydrophilicity. Thus, gelatin and dextran-based hydrogels were obtained as a platform for the release of diclofenac and methotrexate incorporated into nanoparticles of mPEG-co-PCL. The hydrogel was cross-linked from click reactions, with polymer backbone was modified with maleic anhydride and furoic acid, respectively. These reagents contain diene and dienophile groups that allow bond formation through Diels - Alder click reactions. Hydrogel swelling and release of diclofenac potassium have been studied in various dissolution media, showing the increase in swelling capacity resulted in slower drug release. It was possible to obtain mPEG-co-PCL copolymer from the ring-opening polymerization of the ϵ -caprolactone monomer, technique which allowed controlling the length of the hydrophobic segment of the polymer chain. From the synthesized copolymers, polymeric nanoparticles containing methotrexate were obtained for emulsion / solvent evaporation method. The encapsulation efficiency of methotrexate was greater than 80%, while release was shown to be dependent of the copolymer chain size: increasing the hydrophobic segment of the chain reduces the fraction of methotrexate is released, being dependent of slow biodegradation of the PCL chain by the human body. When the mPEG-co-PCL nanoparticles were incorporated into the gelatin hydrogel to evaluate the simultaneous release of diclofenac potassium and methotrexate, it was observed that the hydrophilic drug showed a rapid release from the hydrogel matrix, whereas the hydrophobic drug had a release behavior sustained by degradation of the hydrophobic segment.

Keywords: Click hydrogel, dual drug release systems, polymeric nanoparticles, potassium diclofenac e methotrexate.

LISTA DE ABREVIATURAS

ζ – Potencial Zeta
CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado
COX - enzimas ciclooxigenase
D₂O – Água Deuterada
DCC - N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DFK – Diclofenaco de potássio
DMAP – 4-dimetilaminopiridina
DMSO - Dimetilsulfóxido
DSC – Calorímetro Diferencial de Varredura
FDA - *Food and Drug Administration*
G' – Módulo elástico
G'' – Módulo viscoso
GFS - Fluídos gástricos estomacais
GHS - Glutaciona
GPC – Cromatografia de Permeação em gel
GSSG - Glutaciona dissulfeto
HOMO - Orbital molecular ocupado mais alto
LCST - Temperaturas críticas de solubilidade inferior
LUMO - Orbital molecular não ocupado mais baixo
MHz - Megahertz
MM – Massa molecular
MTX - Metotrexato
NSAIDs - *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*
PBS - Tampão fosfato
PCL - policaprolactona
PEG - Polietilenoglicol
HEMA - poli(2-hidroxietil metacrilato)
PNIPAAm - poli(isopropilacrilamida)
PMMA - polimetilmetaacrilato
PS - Poliestireno
PTFE - Politetrafluoretileno
RMN – Ressonância magnética nuclear
THF - Tetraidrofurano
UV/Vis – Ultravioleta visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RESUMO DOS MODELOS CINÉTICOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS. ADAPTADO DE (10).....	27
TABELA 2. EXPOENTE DIFUSIONAL E MECANISMO DE DIFUSÃO PARA HIDROGÉIS COM FORMAS GEOMÉTRICAS VARIÁVEIS. ADAPTADO DE (12).....	29
TABELA 3. REAGENTES UTILIZADOS CAPÍTULO 1.....	41
TABELA 4. COMPOSIÇÃO DOS HIDROGÉIS EM FUNÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO.	43
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLARES DAS AMOSTRAS DE GELATINA E GELATINA MODIFICADA OBTIDA POR GPC. .	51
TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLARES DAS AMOSTRAS DE DEXTRANA E DEXTRANA MODIFICADA OBTIDA POR GPC58	
TABELA 7. PARÂMETROS OBTIDOS DA CURVA CINÉTICA DE INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS.	69
TABELA 8. PARÂMETROS OBTIDOS DA CURVA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE DICLOFENACO DOS HIDROGÉIS.....	72
TABELA 9. CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE FÁRMACOS COM BASE NA SUA APLICAÇÃO (74).	74
TABELA 10. REAGENTES UTILIZADOS NO CAPITULO 2.....	83
TABELA 11. FATORES E NÍVEIS UTILIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL.....	85
TABELA 12. MASSAS MOLARES DAS AMOSTRAS DE COPOLÍMERO E POLIDISPERSÃO.....	89
TABELA 13. MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL PARA TRIAGEM DAS VARIÁVEIS MAIS RELEVANTES PARA O CONTROLE DO DIAMETRO HIDRODINÂMICO. (A) CONCENTRAÇÃO DE TWEEN80®, (B) VOLUME DE DODECANO E (C) RAZÃO ÓLEO/ÁGUA.....	91
TABELA 14. CARACTERIZAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE METOTREXATO NAS NANOPARTÍCULAS DE MPEG-CO-PCL.....	96
TABELA 15. PARÂMETROS OBTIDOS DA CURVA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE METOTREXATO DAS NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO.	100
TABELA 16. PARÂMETROS OBTIDOS DA CURVA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE DICLOFENACO E METOTREXATO DA PLATAFORMA SIMULTÂNEA DE LIBERAÇÃO.....	108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TIPOS DE RETICULAÇÃO. ADAPTADO DE (5).....	24
FIGURA 2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONVENCIONAL (VERMELHO) E CONTROLADO (AZUL).	26
FIGURA 3. ESQUEMA DA DIFUSÃO (A) E EROSIÃO (B) DE FÁRMACOS EM UMA MATRIZ POLIMÉRICA SÓLIDA. ADAPTADO DE (10).....	27
FIGURA 4. ESQUEMA DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ORBITAIS MOLECULARES NA FORMAÇÃO DO ADUTO DE DIELS-ALDER. ADAPTADO DE (32).....	31
FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS QUE CONSTITUEM A GELATINA. ADAPTADO DE (33).....	32
FIGURA 6. (A) EFEITO DE TRANSIÇÃO SOL – GEL DE GELATINA. (B) ESTRUTURA DO COLÁGENO EM DIFERENTES NÍVEIS MOLECULARES. ADAPTADO DE (36)	32
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA DEXTRANA.	34
FIGURA 8.ESQUEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS EM FUNÇÃO DE ESTÍMULOS. ADAPTADO DE (36).....	35
FIGURA 9.ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO SENSÍVEL À VARIAÇÃO DE POTENCIAL REDOX. ADAPTADO DE (38).	36
FIGURA 10. ESQUEMA DE TRANSIÇÃO SOL – GEL PARA POLÍMEROS TERMOSENSÍVEIS. ADAPTADO DE (48).....	38
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO DICLOFENACO DE POTÁSSIO.....	40
FIGURA 12. MODIFICAÇÃO DA GELATINA COM ANDRIDO MALEICO.	47
FIGURA 13. ESPECTROS DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS DE GELATINA (SUPERIOR) E G_MA (INFERIOR).....	48
FIGURA 14. ESPECTROS ¹³ C RMN NO ESTADO SÓLIDO PARA AMOSTRA DE GELATINA (SUPERIOR) E GELATINA MODIFICADA (INFERIOR).....	50
FIGURA 15. CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE GELATINAS E GELATINA MODIFICADA. COMPRIMENTO DE ONDA UTILIZADO PELO DETECTOR DE UV/VIS 300 NM.	51
FIGURA 16. CURVA DE TITULAÇÃO DE POTENCIAL ZETA PARA AMOSTRA DE GELATINA E GELATINA MODIFICADA.	51
FIGURA 17. TERMOGRAMA DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL DA AMOSTRA DE GELATINA E GELATINA MODIFICADA. (A) PRIMEIRA E (B) SEGUNDA VARREDURA.	53
FIGURA 18. ESQUEMA DA REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE ÉSTERES UTILIZANDO CARBODIIMIDA COMO CATALISADOR. (1) HIDRÓLISE DO INTERMEDIÁRIO O-ACILISOURÉIA, (2) REAÇÃO DIRETA COM HIDRÓXIDOS E (3) FORMAÇÃO DE INTERMEDIÁRIO MAIS ESTÁVEL ATRAVÉS DE REAÇÃO COM N-HIDROXISUCCINAMIDA.	54
FIGURA 19. ESQUEMA DA REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DA DEXTRANA COM ÁCIDO FURÓICO.	54
FIGURA 20. ESPECTROS DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS DE DEXTRANA (SUPERIOR) E DEXTRANA MODIFICADA (INFERIOR).	55
FIGURA 21. ESPECTROS ¹³ C RMN NO ESTADO SÓLIDO PARA AMOSTRA DE DEXTRANA (SUPERIOR) E DEXTRANA MODIFICADA (INFERIOR).....	56
FIGURA 22. DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS ¹³ C RMN NO ESTADO SÓLIDO PARA AMOSTRA DE DEXTRANA (ESQUERDA) E DEXTRANA MODIFICADA (DIREITA).....	57
FIGURA 23. CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE DEXTRANA E DEXTRANA MODIFICADA. COMPRIMENTO DE ONDA UTILIZADO PELO DETECTOR DE UV/VIS 300 NM.	57
FIGURA 24. ESQUEMA DA FORMAÇÃO DA REAÇÃO DE DIELS-ALDER A PARTIR DOS POLÍMEROS MODIFICADOS.....	59

FIGURA 25. ESPECTROS DE UV/VIS DA AMOSTRA H_DA 1:1 MOSTRANDO O AVANÇO DA FORMAÇÃO DO HIDROGEL RETICULADOS POR DIELS-ALDER.....	60
FIGURA 26. (A) PERFIL DO CONSUMO DO GRUPO DIENÓFILO DURANTE A REAÇÃO DE DIELS - ALDER E (B) GRÁFICO DE CINÉTICA 2ª ORDEM PARA REAÇÃO DE DIELS – ALDER.	60
FIGURA 27. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE HIDROGEL.	62
FIGURA 28. PERFIL DE INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS EM ÁGUA.	63
FIGURA 29. VARREDURA DE DEFORMAÇÃO PARA HIDROGEL DE GELATINA.....	65
FIGURA 30. VARREDURA DE FREQUÊNCIA PARA GELATINA E HIDROGEL DE GELATINA RETICULADO POR REAÇÕES DE DIELS – ALDER. G' – SÍMBOLO FECHADO. G'' – SÍMBOLO ABERTO.	65
FIGURA 31. EFEITO DA TEMPERATURA NA TRANSIÇÃO SOL – GEL	66
FIGURA 32. EQUILÍBRIO DE INTUMESCIMENTO DE HIDROGEL EM VÁRIOS FLUÍDOS	67
FIGURA 33. CURVA BI-LOGARÍTMICA DA FRAÇÃO DE SOLUÇÃO ABSORVIDA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIVERSOS FLUÍDOS.	68
FIGURA 34. ESPECTRO Uv/VIS DO FÁRMACO DICLOFENACO DE POTÁSSIO(ESQUERDA) E CURVA ANALÍTICA DA AMOSTRA OBTIDA EM PBS (PBS).	69
FIGURA 35. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE DICLOFENACO DE POTÁSSIO EM DIFERENTES MEIOS DE DISSOLUÇÃO.	70
FIGURA 36. CURVA BI-LOGARÍTMICA DA FRAÇÃO DE DICLOFENACO LIBERADO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIVERSOS FLUÍDOS.	71
FIGURA 37. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS. ADAPTADO DE (86).	78
FIGURA 38. FATORES QUE AFETAM O TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS OBTIDAS PELO MÉTODO DA EMULSÃO/EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE. ADAPTADO DE (92).	80
FIGURA 39. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO METOTREXATO.	82
FIGURA 40. ESQUEMA DE SÍNTESE DO COPOLÍMERO M-PEG-CO-PCL.....	87
FIGURA 41. ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS COPOLÍMEROS MPEG-CO-PCL.	88
FIGURA 42. ESPECTROS DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS DE COPOLÍMERO MPEG-CO-PCL.	88
FIGURA 43. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DE COPOLÍMERO	89
FIGURA 44. EFEITO DOS FATORES E INTERAÇÕES TENDO COMO RESPOSTA O DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS.	92
FIGURA 45. MODELO TRIDIMENSIONAL PARA PREDIÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO MPEG-CO-PCL.	92
FIGURA 46. PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS AMOSTRAS: (A) MPEG-CO-PCL 1:1, (B) MPEG- CO-PCL 1:10 E (C) MPEG-CO-PCL 1:30.	93
FIGURA 47. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS: (A) MPEG-CO-PCL 1:1, (B) MPEG-CO-PCL 1:10 E (C) MPEG-CO-PCL 1:30.....	94
FIGURA 48. POTENCIAL ZETA VERSUS PH PARA AS AMOSTRAS DE NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO.	95
FIGURA 49. (A) ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE METOTREXATO. (B) CURVA ANALÍTICA PARA METOTREXATO NOS COMPRIMENTOS DE ONDA 276, 304 E 372 NM.	97
FIGURA 50. EFICIÊNCIA E TEOR DE INCORPORAÇÃO DE METOTREXATO.	97

FIGURA 51. PERFIL DE LIBERAÇÃO DE METOTREXATO DAS AMOSTRAS MPEG-CO-PCL 1:1, MPEG-CO-PCL 1:10, MPEG-CO-PCL 1:30, MPEG E PCL.	98
FIGURA 52. CURVA BI-LOGARÍTMICA DA FRAÇÃO DE METOTREXATO LIBERADO EM FUNÇÃO DO TEMPO.	99
FIGURA 53. ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO SIMULTÂNEA.	104
FIGURA 54. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS NANOPARTÍCULAS INCORPORADAS AO HIDROGEL.	106
FIGURA 55. VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICA INCORPORADAS AO HIDROGEL DE GELATINA Reticulado por reações de Diels – Alder. G' – SÍMBOLO FECHADO. G'' – SÍMBOLO ABERTO.	107
FIGURA 56. CURVAS DE LIBERAÇÃO DE DFK (SÍMBOLO CHEIO) E MTX (SÍMBOLO VAZIO) DE SISTEMAS DUPLOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.	108
FIGURA 57. CURVA BI-LOGARÍTMICA DA FRAÇÃO DE DICLOFENACO E METOTREXATO LIBERADO EM FUNÇÃO DO TEMPO DA PLATAFORMA SIMULTÂNEA DE LIBERAÇÃO.	108

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	25
Equação 2.....	25
Equação 3.....	46
Equação 4.....	46
Equação 5.....	49
Equação 6.....	55
Equação 7.....	67
Equação 8.....	67
Equação 9.....	85
Equação 10.....	85
Equação 11.....	85
Equação 12.....	92

SUMÁRIO

PROLEGÔMENO.....	20
MOTIVAÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1	23
RETICULAÇÃO DE HIDROGÉIS DE GELATINA/DEXTRANA ATRAVÉS DE REAÇÕES DE DIELS- ALDER.	23
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Definição e classificação de hidrogéis	23
1.2. Intumescimento.....	24
1.3. Liberação controlada de fármacos.....	25
1.4. Reticulação por reações click de Diels-Alder	29
1.5. Gelatina e dextrana como biomateriais	30
1.6. Polímeros inteligentes	33
1.6.1. pH	34
1.6.2. Redox.....	36
1.6.3. Enzimas	37
1.6.4. Temperatura.....	37
1.6.5. Luz	39
1.6.6. Campo Magnético	39
1.7. Diclofenaco de potássio.....	40
2. OBJETIVOS.....	41
3. EXPERIMENTAL.....	41
3.1. Reagentes utilizados:.....	41
3.2. Modificação da gelatina.....	42
3.3. Modificação da Dextrana	42
3.4. Obtenção de hidrogel por reações de Diels – Alder.....	42
3.5. Caracterização:.....	43
3.5.1. Espectroscopia no infravermelho	43
3.5.2. Espectroscopia UV-Visível.....	43
3.5.3. Calorimetria exploratória diferencial	43
3.5.4. Ressonância magnética nuclear H^1 e C^{13}	44
3.5.5. Potencial zeta	44
3.5.6. Diâmetro hidrodinâmico	44
3.5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
3.5.8. Reologia.....	45
3.5.9. Cromatografia de permeação em gel.....	45

3.5.10.	<i>Intumescimento</i>	45
3.5.11.	<i>Liberção de Diclofenaco de potássio</i>	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1.	<i>Modificação e caracterização da gelatina</i>	47
4.2.	<i>Modificação e caracterização da dextrana</i>	53
4.3.	<i>Obtenção e caracterização dos hidrogéis reticulados via reações de Diels-Alder</i>	58
4.4.	<i>Liberção de diclofenaco de potássio da matriz de hidrogel</i>	69
5.	<i>Conclusões parciais</i>	72
CAPITULO 2		73
NANOPARTÍCULAS DE MPEG-CO-PCL PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE METOTREXATO		73
1.	<i>Introdução</i>	73
1.1.	<i>Fármacos hidrofóbicos</i>	73
1.2.	<i>Barreiras fisiológicas</i>	74
1.3.	<i>Nanopartículas poliméricas</i>	77
1.4.	<i>Metotrexato</i>	81
2.	OBJETIVOS.....	82
3.	EXPERIMENTAL.....	82
3.1.	<i>Reagentes utilizados:</i>	82
3.2.	<i>Síntese copolímero mPEG-co-PCL</i>	83
3.3.	<i>Obtenção de nanopartículas de m-PEG-co-PCL: Planejamento fatorial</i>	83
3.4.	<i>Estudo de incorporação e liberção de metotrexato</i>	84
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	86
4.1.	<i>Síntese e caracterização do copolímero m-PEG-co-PCL</i>	86
4.2.	<i>Obtenção de nanopartículas de m-PEG-co-PCL</i>	89
4.3.	<i>Incorporação e liberção de metotrexato</i>	95
5.	<i>Conclusões parciais</i>	100
CAPÍTULO 3		101
PLATAFORMAS DE LIBERAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS		101
1.	INTRODUÇÃO	101
1.1.	<i>Sistemas de liberção controlada simultânea de fármacos</i>	101
1.2.	<i>Interações entre fármacos: diclofenaco versus metotrexato</i>	102
2.	OBJETIVOS.....	103
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	103
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
5.	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	109
6.	CONCLUSÕES	110

7. PERSPECTIVAS FUTURAS	111
REFERENCIAS.....	112

PROLEGÔMENO

A divisão deste manuscrito foi realizada de forma que o leitor possa compreender isoladamente as características de cada uma das plataformas de liberação controlada de fármacos e como estas atuam simultaneamente. Após a apresentação da motivação para elaboração desta tese, cada capítulo foi dividido da seguinte maneira: introdução com uma breve revisão bibliográfica, materiais e métodos, resultados e discussão e as conclusões parciais.

O capítulo 1 aborda o uso de hidrogel como plataforma de liberação de fármacos hidrofílicos. São descritas as modificações necessárias nas cadeias poliméricas para obtenção de hidrogéis reticulados quimicamente, bem como o perfil de intumescimento e liberação de fármacos.

No capítulo 2 foi discutido o uso de nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos hidrofóbicos. São estudados o controle do tamanho de nanopartículas e tamanho de cadeia de copolímeros e sua influência na liberação de metotrexato.

O capítulo 3 discute um sistema misto, no qual as nanopartículas poliméricas estão incorporadas à plataforma de hidrogel e como se comporta a liberação de fármacos com características físico-químicas distintas em um mesmo sistema.

MOTIVAÇÃO

Desde os primórdios da civilização, a humanidade vem lutando contra doenças graves e complexas tais como câncer, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e Parkinson. A maneira com que estas doenças são tratadas não geram impacto negativo apenas nos pacientes, mas também em toda a sociedade. Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de novos tratamentos para extinguir ou, no mínimo, reduzir os danos provocados por estas doenças.

O câncer é uma das principais causas de morte em humanos, perdendo apenas para doenças cardíacas. Em 2012, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 8,2 milhões de pessoas morreram em função da doença no mundo. Ainda segundo a OMS, 15 milhões de novos casos são estimados para 2020. Diante deste quadro, o desenvolvimento de novos materiais deve influenciar significativamente a prática de uma medicina moderna (1). A interdisciplinaridade entre a química, física, biologia e medicina tem obtido resultados satisfatórios em relação à gestão de diagnóstico e tratamento de diversas doenças (2).

Sistemas de liberação controlada de fármacos e/ou moléculas bioativas possuem uma série de vantagem quando comparados com a administração convencional de fármacos: (i) estes sistemas aumentam o tempo de permanência das moléculas bioativas na corrente sanguínea, (ii) permitem direcionar o fármaco para sítios específicos do organismo e (iii) aumentam a eficácia do tratamento e reduzem efeitos colaterais nos pacientes (2). O corpo humano também apresenta fascinante capacidade em responder a estímulos ao ambiente, seja em nível macroscópico ou molecular. Ao tocar um objeto quente, células nervosas enviam sinais para o cérebro que, imediatamente, responde a este estímulo com uma contração muscular, por exemplo. Em nível molecular, um organismo sadio é capaz de liberar insulina com intuito de consumir o excesso de glicose na corrente sanguínea, transformando-o em glicogênio (3).

Com intuito de reproduzir essas características, as pesquisas nas últimas décadas se concentraram em desenvolver dispositivos “inteligentes” a

variação de algum estímulo, seja ele exógeno ou endógeno, para liberação de um único princípio ativo. Estas plataformas continuam sendo promissoras, entretanto os novos desafios encontram-se na combinação de terapias, na qual fármacos com propriedades físico-químicas distintas, tal como a solubilidade, podem estar presentes em um mesmo sistema de liberação, aumentando a eficácia do tratamento. Dentro desse cenário, os sistemas duplos de liberação consistem em combinar uma ou mais plataformas para controlar o comportamento de liberação de cada fármaco independentemente, minimizando assim os efeitos colaterais. A principal motivação deste trabalho reside no desenvolvimento de plataformas de liberação controlada que podem garantir a melhoria da qualidade nos cuidados de saúde, além da criação de novos empregos se estes novos materiais forem produzidos pela indústria farmacêutica.

Capítulo 1

Reticulação de hidrogéis de gelatina/dextrana através de reações de Diels-Alder.

1. Introdução

1.1. Definição e classificação de hidrogéis

Por definição, hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros reticulados capazes de reter grande quantidade de água ou fluido biológico no seu estado intumescido. Devido a versatilidade de síntese, os hidrogéis podem ser utilizados em diversas áreas como a indústria alimentícia, agrônômica e biomédica. Nesta última, os hidrogéis podem ser aplicados na engenharia de tecidos, em implantes biomédicos, na imobilização celular e em dispositivos de liberação controlada de fármacos.

Quanto a sua classificação, os hidrogéis podem ser divididos em função de sua composição ou do tipo de reticulação. A classificação por composição divide os hidrogéis obtidos em: (i) polímeros de origem natural, tais como o alginato, quitosana, dextrana, gelatina, ácido hialurônico, etc; (ii) polímeros de origem sintética, como o polietilenoglicol, poliácido lático, poliácido glicólico, policaprolactana, polivinilalcol e (iii) combinação de polímeros naturais com polímeros sintéticos (4).

Quando classificados pelo tipo de reticulação, pode-se dividir os hidrogéis em duas classes – químicos e físicos. Os hidrogéis reticulados quimicamente correspondem as cadeias de polímeros que estão ligadas através de uma ligação covalente. Estes podem ser obtidos a partir da reticulação na superfície dos polímeros já formados ou ainda na polimerização de monômeros, na qual são utilizados iniciadores e agentes de reticulação para obtenção dos hidrogéis. A literatura comete um deslize na classificação dos hidrogéis reticulados fisicamente. Os hidrogéis físicos são formados por ligação fracas do tipo dipolo-dipolo, eletrostática, interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio, que são tipos de ligação química. A reticulação física deveria ser considerada unicamente pelo enovelamento das cadeias poliméricas. Um

resumo da classificação quanto ao tipo de reticulação está ilustrado na Figura 1. Várias estratégias de reticulação têm sido empregadas na síntese de hidrogéis. A reticulação física é produzida em condições brandas, resultando em interações fracas capazes de provocar baixa estabilidade em tecidos. Por outro lado, quando a reticulação é proveniente de ligações covalentes, são obtidos hidrogéis que apresentam melhor estabilidade, durabilidade e resistência mecânica quando em contato com os tecidos (5,6).

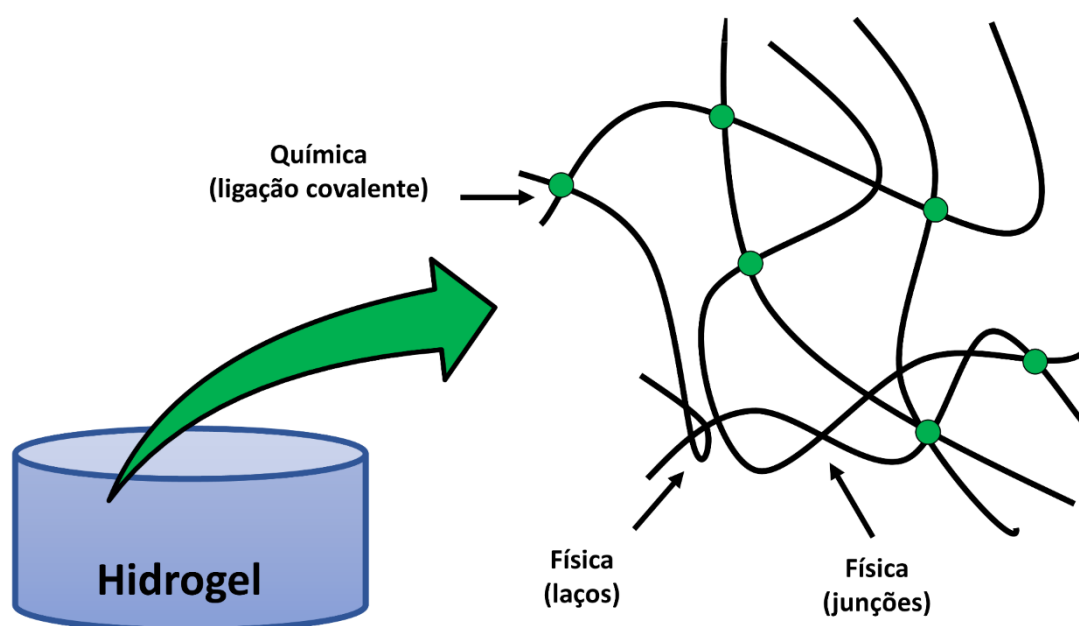


Figura 1. Representação esquemática dos tipos de reticulação. Adaptado de (5)

1.2. Intumescimento

O intumescimento de um hidrogel após atingir seu equilíbrio pode ser compreendido pela teoria de Flory e Rehner (7). Termodinamicamente, duas forças opostas descrevem o estado de equilíbrio quando um gel polimérico atinge seu equilíbrio com o fluido que o envolve: uma componente de mistura e outra componente referente à força elástica. A Equação 1 descreve esta situação em termos da energia de Gibbs no equilíbrio, onde a energia total é igual a zero. A componente elástica corresponde a contribuições de forças retrativas das cadeias poliméricas internas ao gel, enquanto a componente de mistura deve-se as interações entre as moléculas do solvente com as

moléculas do polímero. No equilíbrio, o potencial químico do solvente interno ao gel é igual ao potencial químico do meio externo, portanto as componentes elásticas e de mistura devem se balancear em termos de calor e entropia de mistura. O potencial químico da componente elástica é governado principalmente pelas mudanças de entropia e pode ser justificada por outro trabalho de Flory e Rehner, conhecido como teoria da elasticidade (8). Os pontos de reticulação na estrutura do hidrogel são forçados a assumir menor grau de liberdade em relação as demais porções da cadeia polimérica, que assumem várias configurações. Ao absorver água a estrutura do hidrogel deforma e, conseqüentemente, as cadeias do polímero esticam e atingem um menor grau de liberdade neste estado quando comparado ao estado não deformado, dessa forma a entropia do sistema diminui com a deformação provocada pelo intumescimento (8).

A presença de grupos ionizáveis na estrutura polimérica do hidrogel torna o tratamento teórico do intumescimento mais complexo, isto porque a componente de energia de Gibbs de força iônica deve ser adicionada ao modelo inicial, conforme indicado pela Equação 2. O potencial químico para polímeros ionizáveis apresentam forte dependência da força iônica do meio, bem como das constantes de dissociação de grupos ácidos e/ou básicos presentes na estrutura do polímero (5,9).

$$\Delta G_{Total} = \Delta G_{elástica} + \Delta G_{mistura} \quad \text{Equação 1.}$$

$$\Delta G_{Total} = \Delta G_{elástica} + \Delta G_{mistura} + \Delta G_{força\ iônica} \quad \text{Equação 2.}$$

1.3. Liberação controlada de fármacos

O uso convencional de fármacos baseia-se na administração periódica de um princípio ativo cuja concentração no plasma sanguíneo está abaixo do nível de ação terapêutica em um primeiro momento, permanece por um período de ação efetiva e pode atingir pico acima do nível terapêutico, causando efeitos colaterais ao organismo. Após este ciclo, o fármaco é metabolizado e sua concentração no organismo diminui, sendo necessária a

administração de novas doses para completar o tratamento. As principais críticas a este modelo de administração de fármaco consistem nos efeitos colaterais provocados pela alta dose e pela interrupção do tratamento pelo paciente ao negligenciar os intervalos entre as doses. A proposta dos sistemas de liberação controlada é que uma única dose seja administrada no paciente e que a concentração do princípio ativo seja sustentada por um longo período dentro dos limites de ação terapêutica, sendo liberado o mais próximo possível do sítio de ação, conforme ilustrado na Figura 2. Em modelos mais avançados, o princípio ativo é liberado apenas quando o próprio organismo estimula sua liberação, como será discutido na próxima seção. Uma plethora de sistemas de liberação vem sendo desenvolvidos a partir de polímeros, entre eles, micelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas e hidrogéis.

Genericamente, o sistema de liberação pode ser do tipo matricial ou reservatório. O fármaco deve estar homogeneamente disperso no polímero em sistemas matriciais, enquanto nos sistemas reservatórios a solução de fármaco está aprisionada por uma camada de polímero. Em ambos os casos, a liberação ocorre por difusão do fármaco pelos poros da membrana polimérica

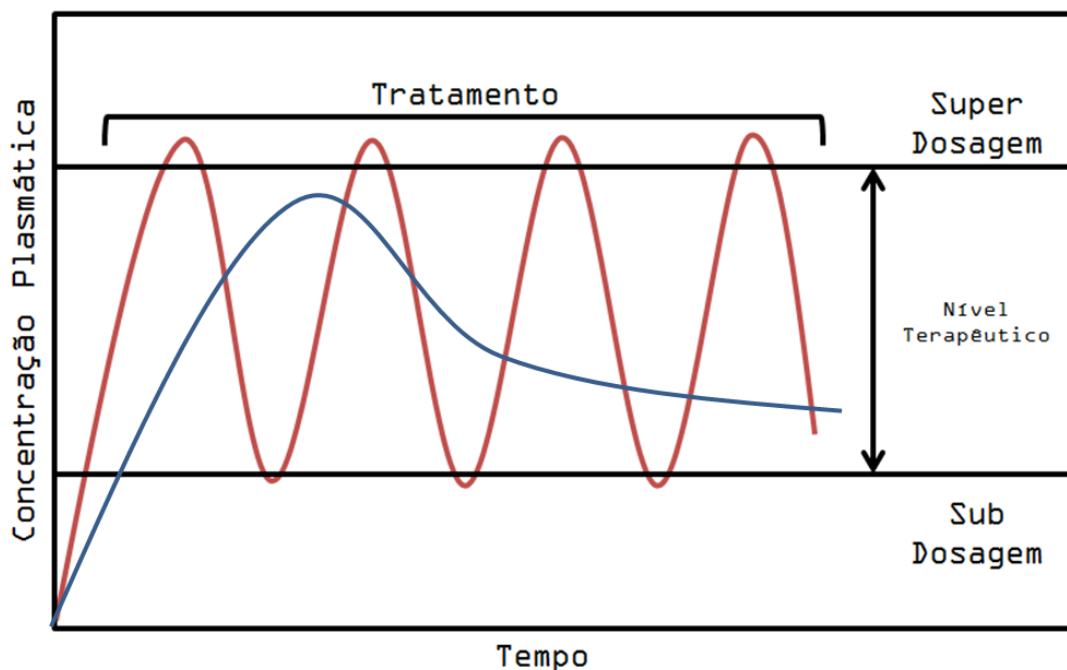


Figura 2. Sistemas de liberação convencional (vermelho) e controlado (azul).

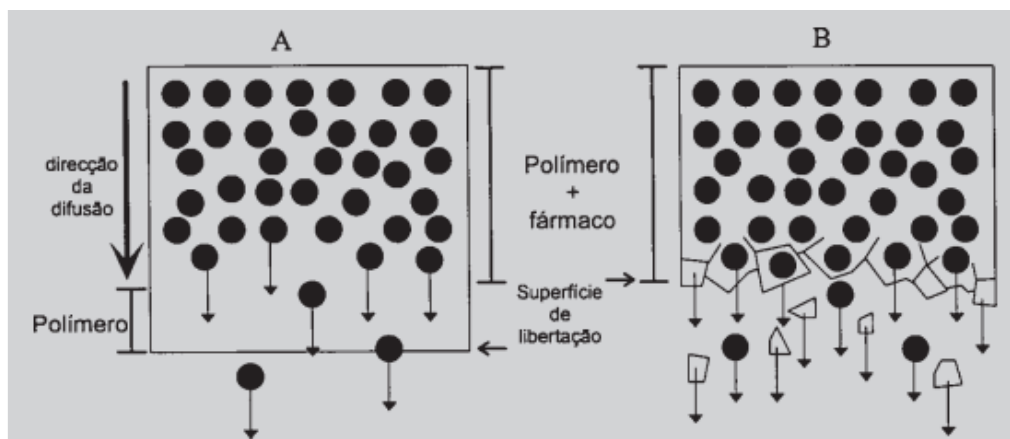


Figura 3. Esquema da difusão (A) e erosão (B) de fármacos em uma matriz polimérica sólida. Adaptado de (10).

e/ou pela erosão do polímero, conforme ilustrado na Figura 3. Quando o polímero é biodegradável a erosão pode ser compreendida como a degradação da matriz.

Diante das várias formas e composições que um sistema de liberação baseado em polímeros pode assumir, diversos modelos cinéticos foram propostos para melhor interpretação quantitativa do mecanismo de liberação. Os modelos mais simples e comumente empregados na elucidação da liberação estão resumidos na Tabela 1, na qual k corresponde a constante cinética de liberação e o expoente refere-se ao mecanismo de liberação relacionado a cada modelo.

Tabela 1. Resumo dos modelos cinéticos de liberação de fármacos. Adaptado de (10).

Modelo	Equação
Ordem zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t$
Primeira ordem	$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = k_1 t$
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{\frac{1}{2}}$
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$

Plataformas que não desagregam e que liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo seguem o modelo de ordem zero. A fração de fármaco liberado em função do tempo é linear e este modelo é dito ideal para amostras de ação prolongada, embora seja muito difícil obtê-lo na prática (11). A cinética de primeira ordem tem um comportamento linear quando o logaritmo da fração de fármaco é graficado em função do tempo. Este modelo de liberação é característico de plataformas de matrizes porosas que liberam fármacos hidrossolúveis, isto é, liberam o fármaco proporcionalmente a quantidade remanescente no interior da plataforma. Higuchi desenvolveu equações para diversos sistemas baseado em formas sólidas e semissólidas, entretanto, a equação simplificada apresentada na Tabela 1 descreve a liberação por processos que obedecem a lei difusional de Fick. Um modelo que descreve exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo foi proposto por Kosmeyer e Peppas. Neste modelo o expoente n é uma constante que caracteriza a plataforma de liberação quanto a sua forma geométrica e características estruturais, permitindo aferir qual o mecanismo de liberação mais apropriado para o material. O modelo de Kosmeyer -Peppas é largamente empregado nas plataformas de liberação poliméricas, justamente por prever se mais de um mecanismo pode estar influenciando na liberação do fármaco. A Tabela 2 resume o mecanismo de liberação para cada valor de expoente e forma geométrica da plataforma estudada.

A difusão de Fick consiste em processo no qual o fármaco dissolvido no interior da membrana a atravessa para equilibrar sua concentração no interior da matriz com o meio de dissolução, com velocidade proporcional de troca entre as soluções interna e externa. Entretanto, o processo de difusão pode sofrer influência das propriedades físico-químicas do polímero que compõe a plataforma de liberação, tais como as interações polímero – solvente e polímero – polímero, alterando as velocidades de difusão. Neste caso, a velocidade de liberação do fármaco é influenciada por processo de relaxação das cadeias poliméricas em função da capacidade de solvatação do meio de dissolução de acordo com as características hidrofílicas ou hidrofóbicas do polímero. Este comportamento é denominado difusão não-Fickiana e pode ser dividida em duas classes: transporte anômalo e transporte caso II. A diferença

Tabela 2. Expoente difusional e mecanismo de difusão para hidrogéis com formas geométricas variáveis. Adaptado de (12)

Expoente difusional (n)			Mecanismo
Filmes finos	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão de Fick
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II

entre os mecanismos não-Fickianos está baseada na velocidade de relaxação do polímero e difusão do solvente para o interior da matriz. No mecanismo anômalo a velocidade de relaxação do polímero e da difusão do solvente para o interior da membrana são da mesma ordem de grandeza, enquanto que para o transporte do caso II a velocidade de liberação de fármaco é controlada majoritariamente pelo relaxamento das cadeias poliméricas (11,12).

1.4. Reticulação por reações click de Diels-Alder

Como citado anteriormente, os hidrogéis quimicamente reticulados apresentam durabilidade e resistência mecânica superiores aos hidrogéis físicos. Entretanto, a maioria das rotas sintéticas para obtenção de hidrogéis químicos utiliza iniciadores, agentes de reticulação cruzada ou condições extremas de síntese. Esterificações, por exemplo, envolvem meios reacionais no qual são utilizados catalisadores extremamente ácidos/básicos, que podem degradar os biopolímeros. O uso de carbodiimidas permite que as esterificações sejam conduzidas em condições mais suaves, por outro lado a principal dificuldade consiste na remoção dos intermediários insolúveis que ficam confinados dentro da rede do hidrogel (13). Diversos autores relatam toxicidade provocada pelo uso de glutaraldeído (14–16). O principal problema consiste no glutaraldeído excedente, que pode se ligar a proteínas ou outras biomoléculas provocando danos. Estes reagentes ou produtos da reação podem introduzir toxicidade que são prejudiciais à aplicação em biomedicina (17–20). Contudo, na última década, uma série de reações clássicas foram revisitadas e aplicadas na reticulação de hidrogéis. Estas reações foram batizadas genericamente de reações *click* devido à alta reatividade e seletividade, além de serem conduzidas sob condições de síntese suaves. A

bioortogonalidade de uma reação *click* permite encapsular moléculas bioativas sem provocar citotoxicidade ao meio. A ausência de catalisadores e a formação mínima de produtos secundários faz destas reações importante ferramenta na obtenção de biomateriais (21,22). São exemplos de reações *click* as cicloadições de alquinos-azidas e Diels-Alder (23–26), adição de Michael – tiol (27–29), entre outras.

A reação de Diels-Alder consiste em uma [4+2] cicloadição entre um dieno conjugado com quatro elétrons π e um dienófilo com dois elétrons π , isto é, um alceno. Esta reação se processa em uma única etapa, sem formação de intermediários, e o estado de transição envolve a formação de duas ligações químicas covalentes. Embora a reação necessite de alta energia de ativação, a presença de carbonila ligada diretamente sobre a dupla ligação do dienófilo aumenta sua reatividade e a reação ocorre sem a presença de catalisadores, além de ser acelerada em água devido a efeitos hidrofóbicos (21,24,30,31).

Por se tratar de uma reação que envolve uma série de elétrons π , a formação das ligações propostas por Diels-Alder pode ser interpretada pela teoria dos orbitais moleculares. A reação ocorre entre os orbitais de barreiras HOMO (orbital molecular ocupado mais alto) e LUMO (orbital molecular não ocupado mais baixo) dos reagentes. Genericamente, o dienófilo é o reagente que tem tendência a atrair os elétrons, sugerindo que o fluxo de elétrons ocorra do dieno conjugado para o dienófilo. Assim, de acordo com a simetria dos orbitais moleculares, a reação se processa do orbital HOMO do dieno para o orbital LUMO do dienófilo, conforme ilustrado na Figura 4, favorecendo a formação de ligações covalentes entre a extremidade da molécula do dieno e a dupla ligação do alceno, devido a sobreposição dos orbitais em fase de cada um dos reagentes (32).

1.5. Gelatina e dextrana como biomateriais

A gelatina é uma proteína proveniente da hidrólise do colágeno animal e é empregada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. É amplamente utilizada devido sua classificação como material geralmente seguro pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão governamental americano que regulariza a liberação de produtos para comercialização, atestando sua aplicação segura

em humanos (33). Como carreador de fármacos, a gelatina provou ser versátil devido as suas características físico-químicas, pois tanto a incorporação como a liberação de fármacos pode ser ajustada, ampliando as áreas de aplicação deste material (34). A distribuição de aminoácidos que constituem a gelatina está apresentada na Figura 5. Considerando as características de cada um dos aminoácidos que compõe a gelatina podemos considerar que 13% de sua estrutura está carregada positivamente devido a aminoácidos como a arginina, 12% confere cargas negativas à estrutura e 11% da cadeia apresenta natureza hidrofóbica. A glicina é o principal aminoácido presente na estrutura da gelatina, correspondendo a um terço do total de moléculas, enquanto o restante é composto de prolina e hidroxiprolina. Como a gelatina é proveniente da desnaturação do colágeno, comercialmente são encontradas dois tipos de gelatina, sendo a do tipo A preparada a partir da hidrólise ácida e cujo ponto isoelétrico encontra-se situado entre pH 7-9 e a do tipo B, proveniente da hidrólise básica, com ponto isoelétrico entre pH 4-5.(16,35)

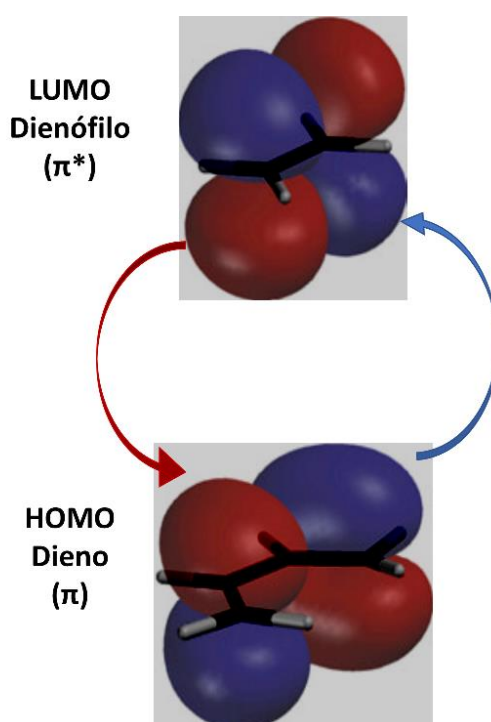


Figura 4. Esquema das interações entre os orbitais moleculares na formação do aduto de Diels-Alder. Adaptado de (32).

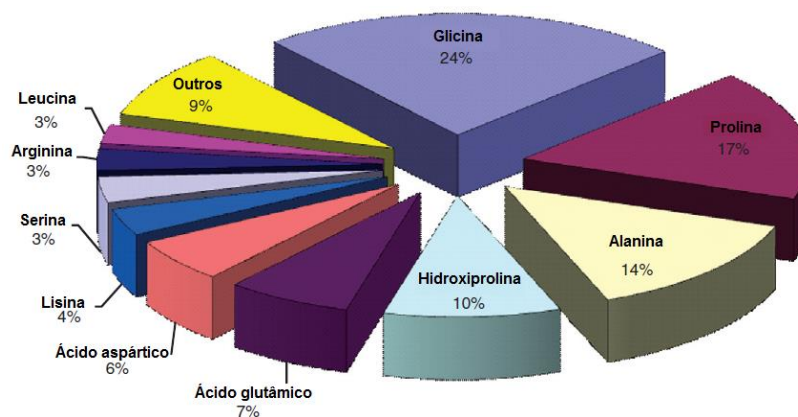


Figura 5. Distribuição dos aminoácidos que constituem a gelatina. Adaptado de (33).

A gelatina é dissolvida com facilidade em água quando a temperatura é superior a 40°C. Contudo, ao resfriar a solução o material passa por uma transição sol-gel, na qual ocorre transição conformacional nas cadeias randômicas da gelatina para a formação de hélices, conforme ilustrado na Figura 6(A). A formação de triplas hélices é decorrente da composição da cadeia de gelatina. Considerando que a cada três resíduos de aminoácidos um deles possivelmente seja glicina, quando uma sequência de glicina-prolina-hidroxiprolina é repetida n vezes há estabilização das cadeias através de ligações de hidrogênio formando a tripla hélice, conforme ilustrado na Figura 6 (B). A estabilização pode ocorrer diretamente entre as cadeias de gelatina, na qual os ácidos carboxílicos interagem com grupo aminos, ou através de ligações entre moléculas de água, ligando dois grupos carboxílicos ou um grupo carboxílico e um grupo amino (36).

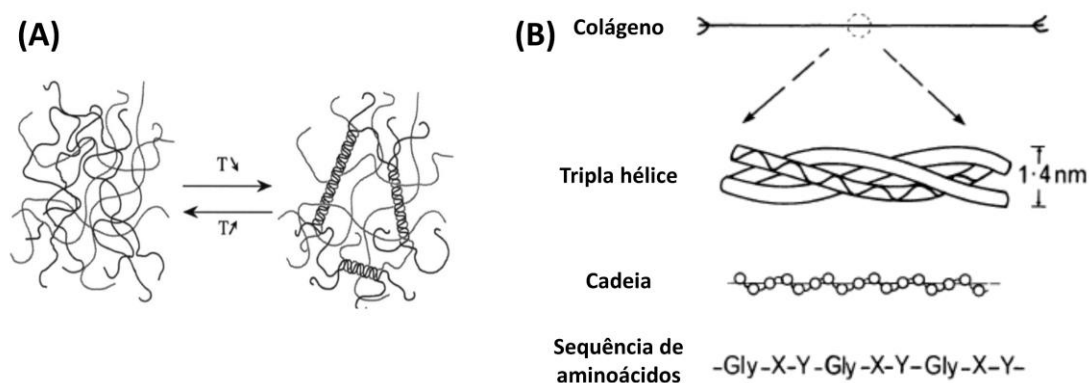


Figura 6. (A) Efeito de transição sol – gel de gelatina. (B) Estrutura do colágeno em diferentes níveis moleculares. Adaptado de (36) .

Como carreador de fármaco, a gelatina apresenta características versáteis na incorporação de biomoléculas carregadas eletrostaticamente. Em função de seu ponto isoelétrico, é possível ajustar a eficiência de incorporação do fármaco de acordo com o pH do meio no qual o material está disperso. Da mesma forma, a cinética de liberação pode ser otimizada tornando a gelatina uma versátil plataforma para engenharia de tecidos ou na terapia de câncer. A associação de outros materiais à gelatina introduz no sistema propriedades múltiplas que não eram atingidas com o material isolado, atuando de maneira sinérgica para melhorar propriedades mecânicas ou ainda a incorporação e liberação de moléculas bioativas (34).

A dextrana é um polímero natural a base de glicose que vem sendo utilizado por mais de 6 décadas em biomedicina devido sua atividade biológica, tal como biocompatibilidade e biodegradabilidade em meio fisiológico. A dextrana pode ser obtida por síntese química ou produzida por bactérias que utilizam a sacarose como principal indutor. De uma maneira geral, a dextrana consiste em um polímero linear ligado nas posições α -1,6-glicosídeos, com algumas ramificações observadas pelas ligações 1,3, conforme esquematizado na Figura 7. Embora sejam observadas ramificações, a dextrana apresenta elevada solubilidade em água. Sua principal característica está no aumento da biodistribuição de moléculas bioativas quando aplicado como carreador de fármaco. Depois de infusão intravenosa, aproximadamente 70% da dextrana (MM = 40 kDa) é excretada do tecido fisiológico pela urina no período de 24 horas. A porcentagem de dextrana restante é retida por poucos dias e despolimerizada por enzimas, tal como a dextranase, no fígado, no baço e no final do sistema gastrointestinal (37). Assim como a gelatina, a dextrana pode ser facilmente modificada pela adição de grupos específicos na sua estrutura através de reações com as hidroxilas do esqueleto polimérico, permitindo que ocorra reticulação cruzada entre suas cadeias para formação de hidrogel (38).

1.6. Polímeros inteligentes

O corpo humano apresenta fascinante capacidade em responder a estímulos ao ambiente, seja em nível macroscópico ou molecular. Ao tocar um objeto quente, células nervosas enviam sinais para o cérebro que,

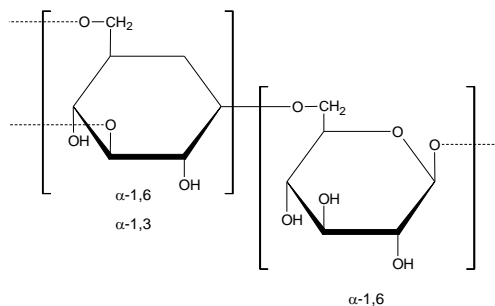


Figura 7. Representação da estrutura da dextrana.

imediatamente, responde a este estímulo com uma contração muscular, por exemplo, ou em nível molecular, quando um organismo sadio é capaz de liberar insulina com intuito de consumir o excesso de glicose na corrente sanguínea, transformando-o em glicogênio (3). Park propõe uma linha do tempo evolutiva de sistemas de liberação controlada de moléculas bioativas na qual, a partir de 1980, há um esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de plataformas “inteligentes” variando-se algum estímulo, seja este de origem exógena ou endógena (39). Genericamente, quando um sistema de liberação controlada é exposto a um estímulo, tais como, uma variação de pH, temperatura, força iônica, campo magnético e/ou luz, a resposta ao estímulo corresponderá a variações em suas propriedades físico químicas, sejam elas uma mudança de conformação, alteração de superfície, solubilidade, entre outras, como esquematizado na Figura 8.

1.6.1. pH

Um dos primeiros estímulos utilizados para liberação de moléculas bioativas pela medicina foi a variação do pH, com foco no sistema gastrointestinal. Isto se deve a ampla faixa de pH que abrange o sistema gastrointestinal – desde as condições ácidas do estômago (pH ~2) até regiões mais básicas como o intestino (pH ~8). Além disso, em nível celular, é possível distinguir células saudáveis de células com estado patológico diferenciado, isto porque as células que apresentam infecções, inflamações ou tumores têm valor

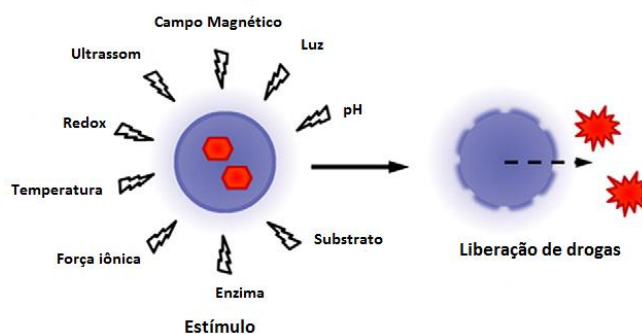


Figura 8. Esquema de liberação controlada de fármacos em função de estímulos. Adaptado de (36).

de pH extracelular inferior ao de células normais (pH ~ 7,4). A acidez é devida a rápida proliferação das células tumorais, alterando a vascularização e oxigenação dos tecidos, por exemplo.

A estratégia para conferir sensibilidade de hidrogéis às variações de pH é a introdução de grupos ionizáveis em sua composição, tais como aminas, ácidos fosfóricos e ácidos carboxílicos. Estes grupos, em função dos valores de pKa e estrutura, podem aceitar ou doar prótons em diferentes condições de pH, alterando suas propriedades físico-químicas, como o intumescimento e solubilidade, resultando em melhor controle na liberação de fármacos, por exemplo. Os polímeros aniônicos mais utilizados contêm ácido carboxílico. Em meio ácido, estes polímeros são protonados e suas estruturas tornam-se relativamente hidrofóbicas. Por outro lado, em condições de pH neutro ou alcalino, o polímero apresenta características hidrofílicas, permitindo a liberação de moléculas bioativas (40). A interpretação deve ser contrária quando o polímero é constituído de grupos aminas, por exemplo.

Dispositivos de liberação de insulina via oral baseados em estruturas caroço@casca de quitosana tem apresentado resultados promissores segundo Mukhopadhyay et al. O estudo comparativo entre hidrogéis de quitosana natural e a N-succinil quitosana, ambas enxertadas com poliácridamida, resultaram na liberação de insulina pH dependente. A poliácridamida foi enxertada à quitosana com o intuito de aumentar a capacidade de incorporação de insulina ao hidrogel.

1.6.2. Redox

As características patológicas do ambiente são sensíveis aos estímulos das reações redox. O compartimento extracelular das células é mais oxidativo quando comparado com o compartimento intracelular. O elevado nível de glutathiona (GHS) no citosol e compartimentos subcelular é o principal responsável pelo caráter redutor do ambiente intracelular. A razão pela qual a concentração de GSH é menor no ambiente intracelular é sua rápida degradação enzimática no plasma humano. Os níveis de GSH foram estudados em células tumorais e normais de citosol e os resultados apontaram que sua concentração é muito maior nas células tumorais. A partir destas observações foi possível desenvolver estratégias de liberação controlada de fármacos diretamente nas células tumorais. O sistema de liberação é funcionalizado com um agente de reticulação de dissulfeto, que é sensível ao GSH. Ao reagir com a enzima, a ligação do dissulfeto é quebrada em duas moléculas de sulfidril, enquanto o GSH é oxidado para GSSG, conforme a Figura 9. (2,41,42).

Ejaz et al relataram a síntese de um sistema redox sensível baseado em hidrogéis de poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) reticulados com bis(2-metacriloxietil) dissulfeto (DSDMA). Utilizando glutathiona (GHS) como agente redutor, foi possível confirmar a ruptura da ligação do dissulfeto, liberando moléculas modelos. Estudos em células de cultura resultaram que a fármaco

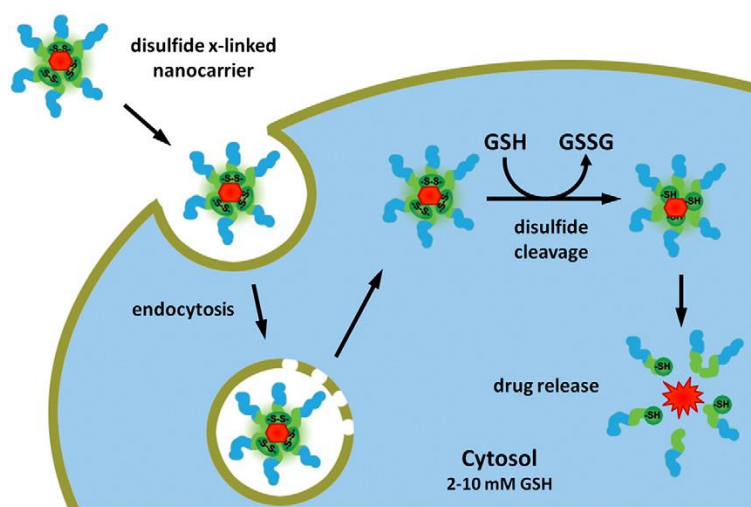


Figura 9. Esquema do mecanismo de ação sensível à variação de potencial redox. Adaptado de (38).

antifibroproliferativa, mitomicina C, pode ser liberada do hidrogel em um período de 7 dias (43).

1.6.3. Enzimas

As enzimas constituem um grupo de proteínas que apresentam atividade e mecanismos de atuação específicos dentro de determinado processo bioquímico no organismo. A seletividade na atuação de enzimas permite sua utilização como estratégia de liberação de moléculas bioativas, pois cada enzima é capaz de hidrolisar uma sequência específica de aminoácidos. Por exemplo, para cortar a sequência de peptídeos alanina-valina e glicina-prolina são usadas as enzimas termolizina e prolina endopeptidase, respectivamente; Assim como nos casos anteriores, foi observado aumento na presença de certas enzimas em estados patológicos, tais como câncer e inflamações, permitindo a ação estratégica de liberação sob estas condições (44). Genericamente, um sistema de liberação controlada sensível a enzimas é constituído de um carreador polimérico (hidrogéis, dendrímeros, micelas), fármaco de interesse e espaçadores sensíveis que são ligados entre o polímero e o fármaco. Os espaçadores são desenvolvidos de forma a apresentar melhor comprimento e estrutura, permitindo melhor acoplamento às enzimas e resultando em maior eficiência de liberação (45).

1.6.4. Temperatura

Diferente das demais fontes de estímulo, a variação de temperatura pode ser provocada endógena ou exogenamente. Sob condições patológicas como, por exemplo, inflamações ou tumores são observados aumento de temperatura nestes sítios em função da maior vascularização dos tecidos. A temperatura também pode ser aumentada em decorrência da aplicação de luz ou campo magnético ao sistema de liberação.

Os polímeros termossensíveis mais investigados são derivados da N-alquilamidas, pois estes materiais apresentam solubilidade em água em função da temperatura, como pode ser observado na Figura 10. As N-alquilamidas agregam-se acima de determinadas temperaturas, denominadas temperaturas

críticas de solubilidade inferior (LCST). O processo de agregação é dependente da entropia do sistema e influenciado pelas interações polímero-solvente e polímero-polímero. O aumento da entropia favorece a agregação com o aumento da temperatura, resultando em energia livre de agregação negativa e, conseqüentemente, em um processo espontâneo. Entre as N-alquilamidas, o poli(isopropilacrilamida) (PNIPAAm) é o polímero mais intensivamente estudados. O PNIPAAm apresenta valor de LCST de 32°C (46,47), sendo solúvel na temperatura corpórea (aproximadamente 36,5°C). Para atingir valores de LCST acima de 37°C e se tornar sensível à liberação no corpo humano, o PNIPAAm deve ser enxertado com polímeros hidrofílicos, tais como a hidroximetilacrilamida, acrilamida ou vinilpirrolidona.

O valor de LCST do PNIPAAm foi modificado por Cheng et al (48), a fim de se obter um sistema de liberação de metotrexato, um fármaco hidrofóbico utilizado para tratamento de câncer. Micelas com cadeias hidrofílicas de PNIPAAm-co-HMAAm e hidrofóbicas de PMMA apresentam valor de LCST de 37,9°C, apresentando características desejáveis para liberação do metotrexato apenas em tecidos sob estados patológicos. Strong (49) et al desenvolveram hidrogel de poli(isopropilacrilamida)-co-acrilamida, nas proporção de 95:5. Nanopartículas de sílica recobertas com ouro apresentam ressonância plasmônica quando irradiadas com radiação no comprimento de onda do infravermelho próximo, dissipando energia na forma de calor. Assim, doxorrubicina foi incorporada ao hidrogel contendo as nanopartículas. O hidrogel apresenta valor de LCST acima de 37°C, resultando em aumento significativo de liberação após o sistema ser submetido à radiação.

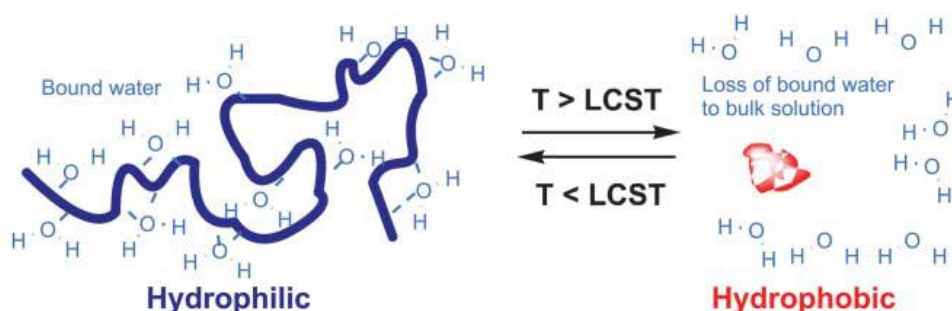


Figura 10. Esquema de transição sol – gel para polímeros termossensíveis. Adaptado de (48).

1.6.5. Luz

A luz pode ser empregada como estímulo externo nos sistemas de liberação em função do comprimento de onda aplicado. O tipo de radiação empregada deve ser escolhido em função do sítio de aplicação da luz, pois o ultravioleta não permite profunda penetração no corpo devida à absorção pela pele, sangue e tecidos. No entanto, a radiação na região do infravermelho próximo permite atingir profundidade de até 10 cm sem danificar as células. O estímulo por luz pode ser considerado uma estratégia não invasiva de liberação. Em relação ao uso exclusivo da luz como fonte de estímulos, diversos mecanismos podem estar associados à liberação, como por exemplo, a isomerização, reticulação, oxidação, polarização, degradação de polímeros (41).

1.6.6. Campo Magnético

A vantagem no uso de materiais magnéticos em liberação controlada de fármacos reside em aplicar campo magnético externo para atraí-los para um local específico do corpo e mantê-los neste sítio durante a ação terapêutica. A concentração do sistema de liberação em um sítio específico no corpo diminui a necessidade de grandes doses para garantir alta concentração local, reduzindo a toxicidade e o desconforto causado por efeitos colaterais (50). O material magnético pode ter sua superfície funcionalizada para conjugação de fármacos ou ainda estar incorporado dentro de hidrogéis. Além disso, os materiais magnéticos apresentam importantes características no tratamento terapêutico por provocar apoptose de células tumorais através do aumento da temperatura em uma região específica do corpo. A hipertermia magnética é um tratamento seletivo, pois independente da presença de células saudáveis, a variação de temperatura é prejudicial apenas às células tumorais. De uma forma geral, o procedimento consiste na internalização das nanopartículas magnéticas nas células problemáticas, seguido da aplicação de campo alternado com força e frequência suficiente para causar o aquecimento das nanopartículas. O calor gerado é dissipado para o tecido doente até a destruição das células tumorais, que ocorre na temperatura de 41 a 46°C, aproximadamente. Vários componentes da célula são afetados pelo aumento

da temperatura, tais como membrana, citoesqueleto, síntese de macromoléculas ou ainda reparos na fita do DNA. Os mecanismos molecular/biológico causado pelo aumento da temperatura ainda estão sob investigação, mas seus efeitos são os responsáveis pela apoptose celular (51–53). O aquecimento ocorre quando um campo magnético alternado é aplicado às nanopartículas magnéticas, dissipando calor durante a reorientação da magnetização do material.

1.7. Diclofenaco de potássio

O diclofenaco (Figura 11) é um fármaco classificado como NSAIDs (do inglês nonsteroidal anti-inflammatory drugs) que apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatória e antipirética. O diclofenaco é um derivado do ácido fenilacético que está disponível em formulações orais na forma de sais de sódio ou potássio, majoritariamente. Entretanto o tratamento com este fármaco tem apresentado efeitos adversos significativos, tais como problemas cardiovasculares, gastrointestinais e hepáticos (54). O mecanismo de ação do diclofenaco não é compreendido por completo, entretanto Vane (55) propôs que as enzimas ciclooxigenase (COX) são inibidas na presença de NSAIDs. Estas enzimas são responsáveis pela degradação do ácido araquidônico, proveniente do metabolismo da parede celular, em dois compostos, os tromboxanos e as prostaglandinas que são os principais responsáveis como mediador nas inflamações e na dor.

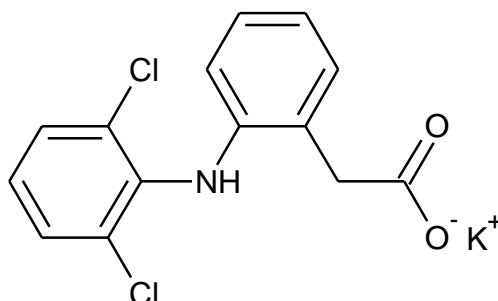


Figura 11. Representação da estrutura molecular do diclofenaco de potássio.

2. Objetivos

O objetivo deste capítulo consiste na obtenção de hidrogel de gelatina e dextrana modificada para usos em sistema de liberação controlada de fármaco hidrofílico.

Os objetivos específicos incluem:

- Modificação da gelatina com anidrido maleico;
- Modificação da dextrana com ácido furóico;
- Obtenção de hidrogel através da reticulação por reações de Diels-Alder;
- Estudo de intumescimento e liberação de diclofenaco de potássio em diferentes fluidos.

3. Experimental

3.1. Reagentes utilizados:

Todos os reagentes utilizados na síntese dos precursores e hidrogéis apresentam pureza analítica e compõe a Tabela 3. Os reagentes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio para promover a purificação dos mesmos, com exceção do dimetilsulfóxido, cuja água foi removida com peneiras moleculares.

Tabela 3. Reagentes utilizados capítulo 1.

Reagentes	Fórmula Molecular	Marca
4-Dimetilaminopiridina (DMAP)	C ₇ H ₁₀ N ₂	Alfa Aesar
Ácido furóico	C ₅ H ₄ O ₃	Sigma
Anidrido maleico	C ₄ H ₂ O ₃	Alfa Aesar
Dextrana (40kDa)	C ₆ H ₁₀ O ₆	Sigma
Diclofenaco de Potássio (DFK)	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NOK	Sigma
Dimetilsulfóxido (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	Merck
Gelatina	-	Synth
N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	C ₁₃ H ₂₂ N ₂	Sigma

3.2. Modificação da gelatina

Para obtenção de hidrogéis reticulados através de reações de Diels-Alder é necessário modificar a estrutura dos polímeros precursores com reagentes que permitam a formação de um aduto de Diels-Alder. Nesta etapa, a gelatina foi modificada com o anidrido maleico, no qual 1,5 g de gelatina foi dissolvida em 30,0 mL de DMSO anidro na temperatura de 60,0 °C em um balão de fundo redondo. Após completa solubilização, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e 1,0 g de anidrido maleico foi adicionado ao balão. O sistema foi mantido sob agitação durante 3,0 horas. Após este período, a gelatina modificada foi mantida sob aquecimento pelo período de 3,0 horas à 70,0°C. Após esta etapa a amostra foi dialisada em membrana com poros de 2kDa, durante dois dias contra água. A amostra foi denominada G_MA.

3.3. Modificação da Dextrana

Para modificação da dextrana com ácido furóico foi necessário ativar os reagentes separadamente. Em um erlenmeyer uma massa de 1,5 g de dextrana foi adicionada em 15,0 mL de DMSO e, após completa dissolução, foi adicionado 1,0 g de DMAP ($8,9 \times 10^{-3}$ mol). Em outro erlenmeyer, 1,0 g de ácido furóico ($8,9 \times 10^{-3}$ mol) foi dissolvido em 15,0 mL de DMSO e ativado com 1,8 g de DCC ($8,9 \times 10^{-3}$ mol). Os dois sistemas foram mantidos sob agitação magnética pelo período de 3,0 horas, a temperatura ambiente. Na sequência, a solução contendo o ácido furóico foi transferida para o erlenmeyer contendo dextrana e o sistema foi mantido a temperatura ambiente, sob agitação, durante 48,0 horas. A dextrana foi precipitada em acetona gelada e separada por centrifugação. A amostra foi dialisada contra água durante dois dias para remoção dos reagentes que não foram ligados a estrutura da dextrana. A amostra foi liofilizada e denominada Dex_AcF.

3.4. Obtenção de hidrogel por reações de Diels – Alder

Para a reticulação dos hidrogéis por reações de Diels-Alder as amostras G_MA e Dex_AcF foram misturadas em diferentes proporções conforme a Tabela 4. As massas dos polímeros modificados foram solubilizadas em 300 μ L

de tampão fosfato (pH 7,4), dispersas em vortex e sonicadas por 2 horas a temperatura ambiente. Na sequência as amostras foram aquecidas a 65,0 °C durante 48,0 horas em estufa e liofilizadas após este período. O formato das amostras corresponde a cilindros de 10,0 mm de diâmetro por 10,0 mm de altura.

Tabela 4. Composição dos hidrogéis em função do grau de substituição.

Hidrogel	Dex_AcF (mg)	G_MA (mg)
H_DA 3:1	80	70
H_DA 1:1	40	110
H_DA 1:3	15	135

3.5. Caracterização:

3.5.1. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos com o espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, da Perkin Elmer, Frontier. Para coleta dos espectros foram realizadas 128 varreduras entre o intervalo 4000 a 550 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos pela técnica de reflectância total atenuada, utilizando cristal de seleneto de zinco.

3.5.2. Espectroscopia UV-Visível

Os espectros Uv-Visível foram obtidos por espectrofotômetro da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 465.

3.5.3. Calorimetria exploratória diferencial

O comportamento térmico das amostras foram avaliados por calorimetria exploratória diferencial em um equipamento TA, modelo Q100. Os testes foram realizados entre 25,0 e 250,0 °C, com taxa de aquecimento de 10,0 °C min^{-1} , sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$.

3.5.4. Ressonância magnética nuclear H¹ e C¹³

Os espectros de ressonância magnética nuclear H¹ das amostras de gelatina e gelatina modificada foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance 600 MHz. As amostras (10 mg) foram solubilizadas em D₂O. A linha de referência empregada na análise foi de 4,79 ppm referente a D₂O. As amostras de copolímero mPEG-co-PCL foram analisadas em espectrômetro Bruker 300 MHz. As amostras (10 mg) foram solubilizadas em CDCl₃, utilizando como referência o pico do solvente em 7,29 ppm.

Os espectros de ressonância magnética nuclear C¹³ obtidos no estado sólido foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III HD 400WB. As amostras em pó foram compactadas em cilindros de 4mm e firados em velocidade de 10000 Hz, com tempo de contato de 2 ms. Foi utilizado o modelo de Voigt para deconvolução dos espectros.

3.5.5. Potencial zeta

O potencial Zeta (ζ) foi medido em um aparelho Zetasizer Nano ZS, marca Malvern. As amostras foram dispersas em solução de NaCl 0,001 mol L⁻¹. O potencial Zeta foi avaliado em intervalo de pH compreendido entre 2 e 12 e utilizado como titulante soluções de HCl 0,001 mol L⁻¹ e NaOH 0,001 mol L⁻¹.

3.5.6. Diâmetro hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico das amostras foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, marca Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. As amostras foram dispersas em água destilada a uma temperatura de 25° C.

3.5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em microscópio JEOL, modelo JSM-7500F. Foi utilizado feixe de elétrons de 2 kV. Foi utilizado o software ImageJ, versão 1,45s para o tratamento das imagens.

3.5.8. Reologia

As propriedades reológicas do hidrogel foram determinadas em reômetro TA Instruments. O diâmetro dos pratos paralelo utilizado foi de 60 mm, com distância de 200 micrometros. A região linear de viscoelasticidade foi determinada entre a porcentagem de deformação de 0 e 1%. Para determinar o módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') foi utilizada frequências de 100 a 700 rad s^{-1} , nas temperaturas de 37 °C e 42 °C.

3.5.9. Cromatografia de permeação em gel

A distribuição de massa molecular do copolímero foi determinada em um cromatógrafo de permeação em gel OMNISEC, da Malvern Instruments. Foi utilizado os detectores de índice de refração Viscotek RImax (Malvern Instruments) e de Uv/Vis Knauer, modelo UVD 2.1s.

As amostras de gelatina e dextrana, com e sem modificações, foram diluídas em uma solução 0,1 mol L^{-1} de NaNO_3 e filtradas em membranas de PTFE 0,45 μm . Foram utilizadas três colunas cromatográficas da marca Shodex, modelo SB-806 HQ (SHOWA Denko, Tóquio, Japão), cuja temperatura foi mantida constantemente a 40 °C. Foi utilizado fluxo de injeção de THF na razão de 1,0 mg mL^{-1} . A curva de calibração foi obtida a partir de padrões de PEG, cujas massa moleculares estão compreendidas entre 224000 e 195 g mol^{-1} (Varian Palo Alto, CA).

As de amostras do copolímero mPEG-co-PCL (10,0 mg) foram diluídas em THF e filtradas em membranas de PTFE 0,45 μm . Foram utilizadas três colunas cromatográficas da marca Shodex, modelo KF806M (SHOWA Denko, Tóquio, Japão), cuja temperatura foi mantida constantemente a 40 °C. Foi utilizado fluxo de injeção de THF na razão de 1,0 mg mL^{-1} . A curva de calibração foi obtida a partir de padrões de PS, cujas massa moleculares estão compreendidas entre 1×10^6 e 1200 g mol^{-1} (Varian Palo Alto, CA).

3.5.10. Intumescimento

O grau de intumescimento foi determinado por gravimetria. A massa do hidrogel seco (m_0) foi pesada e imersa em água, tampão fosfato (pH 7,4) ou

ácido clorídrico (pH 2,0). A porcentagem de água absorvida foi determinada pelo aumento da massa (m_t) do hidrogel em função do tempo, que, antes da pesagem, foi removido da solução e cuidadosamente seco para remoção de excesso de água. O intumescimento foi calculado de acordo com a Equação 3 (35).

$$\text{Intumescimento} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 (\%) \quad \text{Equação 3.}$$

3.5.11. Liberação de Diclofenaco de potássio

O diclofenaco de potássio foi incorporado na amostra de hidrogel após a reação de reticulação. Após a amostra ser liofilizada, 300 μL de uma solução 23,3 mg mL^{-1} de diclofenaco de potássio (aproximadamente 5% em relação a massa de polímero) foi adicionada sobre o hidrogel, que permaneceu por 12 horas para absorção do fármaco. Após este período a amostra foi liofilizada novamente para posterior teste de liberação. A eficiência de incorporação de diclofenaco de potássio pode ser considerada 100,00%.

A liberação do diclofenaco foi testada em diferentes meios: água, tampão fosfato (pH 7,4) e simulado de fluido gástrico (pH 2,0). As amostras foram dispersas em 20,0 mL de cada fluido e mantidas sob agitação de 200 rpm e a temperatura de 37,0 °C. Alíquotas de 1,0 mL foram removidas em função do tempo e sua concentração determinada por espectroscopia UV-Vis. O mesmo valor de fluido foi repostado a solução inicial e a liberação cumulativa de diclofenaco de potássio foi calculada de acordo com a Equação 4, no qual m_{DFK} corresponde a massa de diclofenaco de potássio presente no hidrogel, V_0 é o volume total do meio de liberação ($V_0=20,0$ mL), V_t é o volume de alíquotas removida no tempo t ($V_t=1,00$ mL) e C_n é a concentração de diclofenaco na amostra (56).

$$\text{Liberação } (\%) = \frac{V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{DFK}} \times 100 \quad \text{Equação 4.}$$

4. Resultados e discussão

4.1. Modificação e caracterização da gelatina

A gelatina foi modificada com anidrido maleico para ancorar grupos dienófilos sobre a cadeia polimérica. A modificação da gelatina pelo anidrido maleico ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, os grupos amins e/ou hidroxilas da gelatina realizam ataque nucleofílico em um grupo carboxílico do anidrido maleico, rompendo a ligação entre o oxigênio e a carbonila. Para evitar a hidrólise do anidrido maleico e aumentar o rendimento da reação foi utilizado DMSO anidro como solvente. Nesta etapa, foi observado mudança na coloração da solução de gelatina, passando de amarelo claro para um tom marrom escuro. Entretanto, um anidrido cíclico pode ser obtido por aquecimento e a segunda etapa consistiu em uma reação de formação do anel de maleimida. O esquema de síntese pode ser observado na Figura 12.

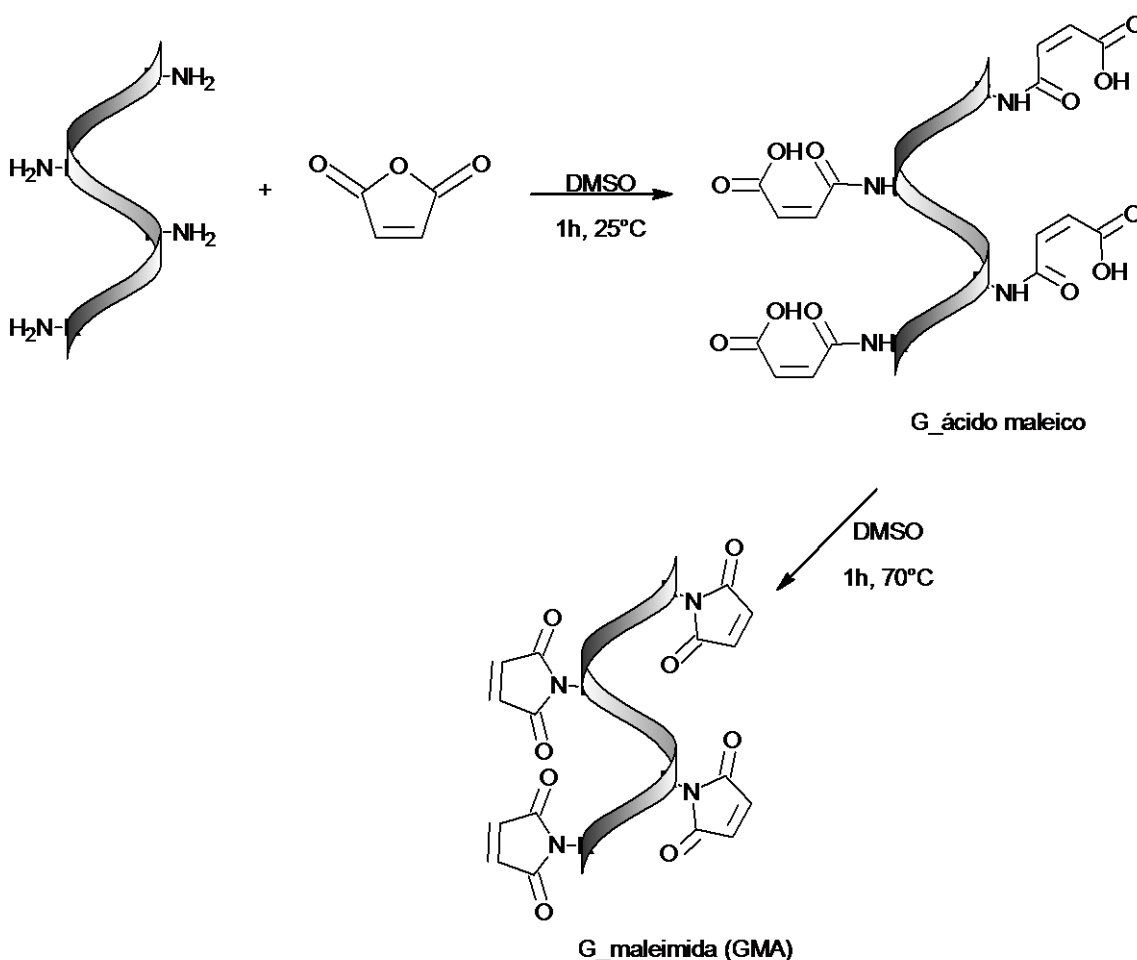


Figura 12. Modificação da gelatina com anidrido maleico.

A Figura 13 apresenta os espectros de ^1H RMN das amostras de gelatina e G_MA. A presença do anel de maleimida é confirmado devido a presença do pico em 6,28 ppm. Observa-se que os picos da gelatina foram mantidos após sua modificação e que a etapa de ciclização foi eficiente devido à ausência de um duplo dubleto entre 6,0 e 6,6 ppm, referente aos prótons da dupla ligação do ácido maleico.

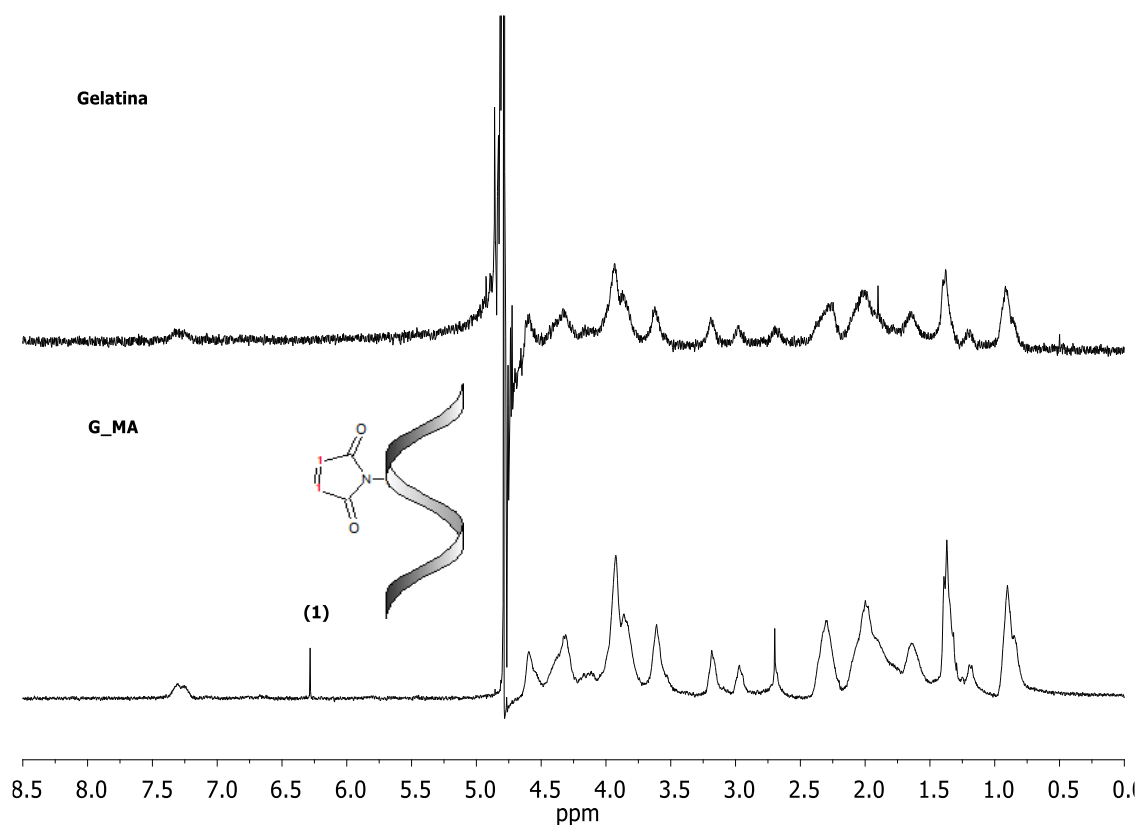


Figura 13. Espectros de ^1H RMN das amostras de gelatina (superior) e G_MA (inferior)

O grau de substituição foi calculado com base nas áreas dos prótons do anel de maleimida e dos prótons da fenilalanina, identificados entre 7,1 e 7,4 ppm. A fenilalanina foi selecionada por se tratar do único aminoácido que apresenta um grupo benzeno em sua estrutura, facilitando sua identificação no espectro. A Equação 5 foi utilizada para os cálculos, no qual A_G corresponde a área da fenilalanina, A_{MA} a área da maleimida e a razão 5/2 a relação de prótons envolvidos na integração, de acordo com a equação proposta por Elomaa et al (57). O valor calculado para o grau de substituição foi de 93,6%.

Por outro lado, o sinal da fenilalanina corresponde a apenas 2% dos sinais totais de gelatina e, portanto, o grau de substituição corresponde a 1,8%.

$$GS = \frac{5 A_{MA}}{2 A_G} \quad \text{Equação 5.}$$

Embora a amostra tenha sido exaustivamente dialisada, é possível confirmar a modificação da gelatina por ^{13}C RMN no estado sólido (58). A heterogeneidade da matriz de gelatina dificulta a interpretação de todos os picos no espectro Figura 14, mas foi possível identificar carbonila e ácido carboxílico em 173,96 ppm proveniente, principalmente, da glicina, uma vez que é o aminoácido mais abundante. O pico em 158,78 ppm corresponde ao carbono C_6 de arginina e os picos entre 127 e 138 ppm são relativos aos grupos aromáticos da fenilalanina (59). A região alifática da gelatina, compreendida entre 10 e 80 ppm, não é totalmente resolvida, porém observa-se o deslocamento de alguns picos nesta região (indicados por barras) que confirmam a modificação da gelatina por uma ligação covalente no espectro da amostra G_MA. Além disso, é observado um ombro em 180,54 ppm na região da carbonila, que pode ser atribuído aos carbonos 1 e 4 da estrutura cíclica da maleimida, enquanto que os carbonos 2 e 3 aparecem na mesma região dos grupos aromáticos da fenilalanina, alterando os deslocamentos na amostra modificada.

A inserção dos grupos dienos na estrutura da gelatina não alterou significativamente o tamanho das cadeias da gelatina. O perfil cromatográfico da amostra de G e G_MA pode ser observado na Figura 15. Avaliando o resultado com base no detector de índice de refração, é observado uma única população para a amostra de gelatina, com um pequeno ombro com tempo de retenção em 28,9 mL. Entretanto, após a adição dos grupos dienos, este ombro é suprimido e é observado um pequeno aumento das massas moleculares, conforme indicado na Tabela 5. Os resultados obtidos por GPC também permitiram confirmar a modificação da gelatina. Quando o perfil cromatográfico é monitorado pelo detector de UV/Vis em comprimento de onda em 300 nm, é observado baixo sinal para a amostra de Gelatina. Após modificação o sinal

aumenta consideravelmente na mesma faixa de volume de retenção, indicando a presença do anel de maleimida na superfície da amostra G_MA. A presença e/ou ausência dos ombros observados pelo detector de UV/Vis nas amostras não foi elucidada devido à complexidade da matriz de gelatina, uma vez que a sequência de aminoácidos pode ter conjugação alterada de acordo com a posição do grupo maleimida enxertado na cadeia da gelatina, aumentando ou diminuindo a intensidade de absorção em 300 nm.

A modificação da gelatina também foi avaliada por curvas de potencial Zeta em função do pH. A gelatina utilizada no estudo é proveniente de hidrólise básica, ou seja, gelatina do tipo B, cujo ponto isoelétrico foi obtido em pH igual a 5,05, conforme observado na Figura 16. Durante a etapa de modificação podemos inferir que os grupos amino da gelatina participam da reação com o anidrido maleico, deslocando o ponto isoelétrico em pH igual a 4,36. Isto porque os grupos amino disponíveis na superfície da amostra são substituídos por grupos não protonáveis, deslocando o ponto isoelétrico para valores inferiores aos da gelatina sem modificação.

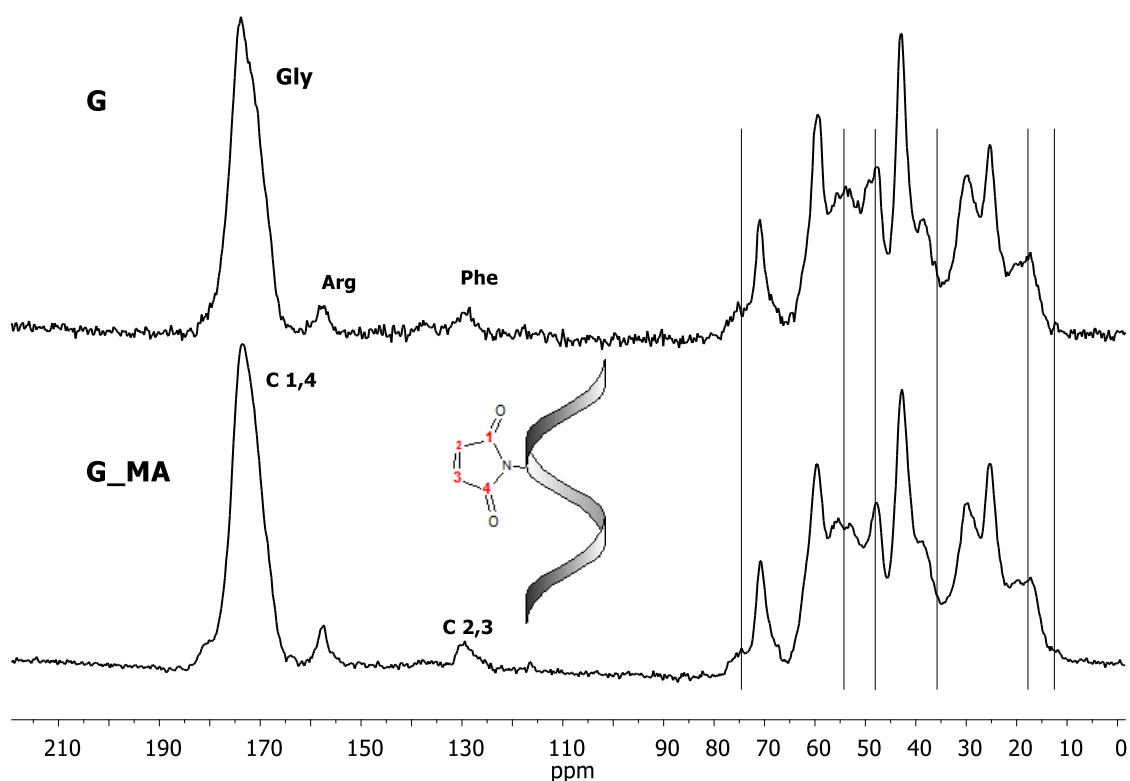


Figura 14. Espectros ^{13}C RMN no estado sólido para amostra de gelatina (superior) e gelatina modificada (inferior).

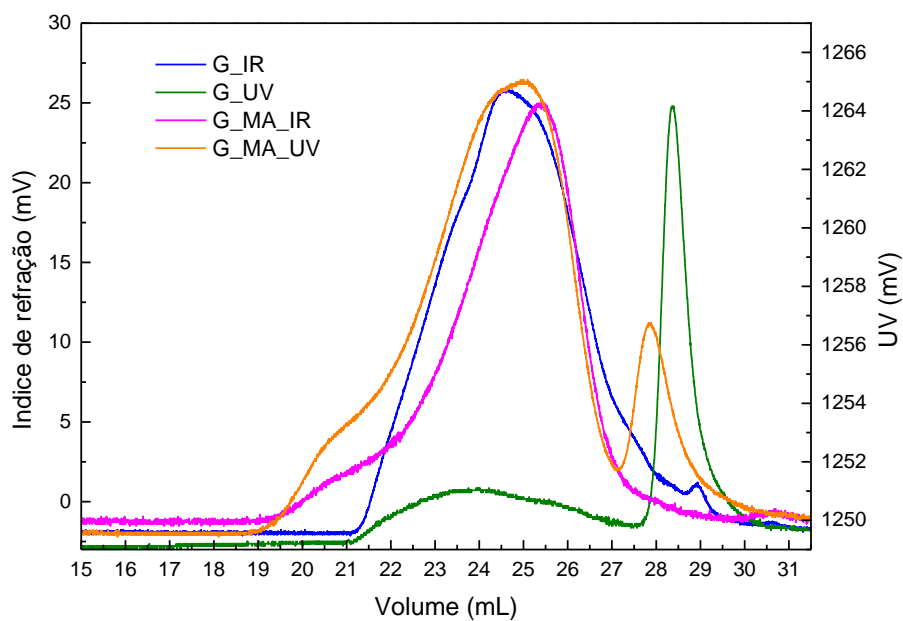


Figura 15. Cromatogramas das amostras de gelatinas e gelatina modificada. Comprimento de onda utilizado pelo detector de UV/Vis 300 nm.

Tabela 5. Distribuição das massas molares das amostras de gelatina e gelatina modificada obtida por GPC.

Amostra	Mn (g mol ⁻¹)	Mw (g mol ⁻¹)	Mw/Mn
G	29500	81600	2,76
G_MA	30400	118200	3,89

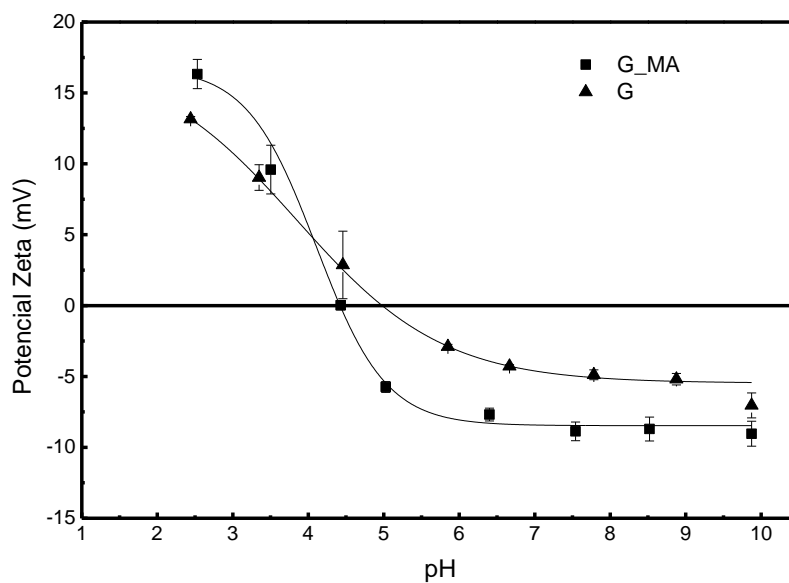


Figura 16. Curva de titulação de potencial zeta para amostra de gelatina e gelatina modificada.

O comportamento térmico da amostra de gelatina e gelatina modificada foi analisado por DSC conforme pode ser observado na Figura 17. A Figura 17 (A) corresponde à primeira varredura do experimento e são observados três picos característicos na amostra de gelatina. Estes apresentam transição endotérmica, no qual o pico em 88°C é atribuído a mobilidade de franjas amorfas, em 121°C corresponde a fusão de zonas de junção cristalina e o pico em 234°C é referente a transição da estrutura com hélices para estruturas randômicas (60,61). No entanto, para a amostra G_MA, o pico referente à formação da tripla hélice é observado com menor intensidade, isto é, os grupos maleimida incorporados na estrutura da gelatina também estão ligados na sequência glicina-prolina-hidroxiprolina, responsáveis pela formação da tripla hélice através de ligações de hidrogênio entre as cadeias de gelatina. Foi observado que após a etapa de modificação da gelatina, a amostra não gelificou após resfriamento.

A variação da temperatura permite que as cadeias da gelatina se associem novamente para formar estruturas similares a inicial à medida que a solução é resfriada abaixo de sua temperatura de transição. Este fenômeno é muito semelhante a cristalização de polímeros sintéticos, no qual é verificado a renaturação da estrutura de tripla hélice, modificando seu comportamento de fusão. Quando a gelatina é resfriada e reaquecida próximo à sua temperatura de transição vítrea, é observado variação de entalpia, cujo valor diminui em direção ao equilíbrio. Portanto, a área sob este pico endotérmico na Tg pode ser usada para quantificar a extensão do relaxamento da entalpia (62). A Figura 17 (B) é referente a segunda varredura do experimento, na qual é possível observar o fenômeno supracitado onde, após resfriamento rápido, as transições endotérmicas são suprimidas devido à falta de arranjo das estruturas da gelatina. A transição vítrea obtida na segunda varredura aumenta de 206 °C para 225 °C com a modificação da gelatina. Este aumento deve estar relacionado a interações entre as cadeias da gelatina com os grupos maleimida. Embora a formação da tripla hélice não tenha sido observada após modificação, a presença dos grupos maleimida desloca a transição vítrea para temperaturas mais altas.

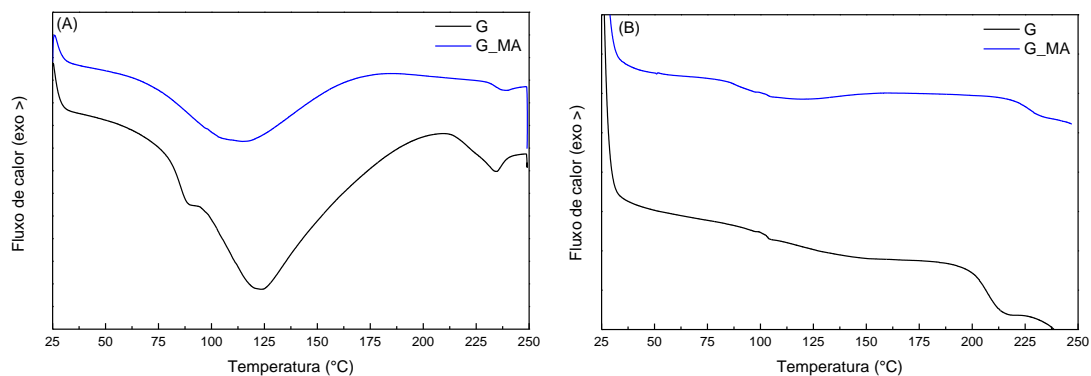


Figura 17. Termograma de calorimetria exploratória diferencial da amostra de gelatina e gelatina modificada. (A) primeira e (B) segunda varredura.

4.2. Modificação e caracterização da dextrana

A modificação da dextrana ocorreu pelo enxerto de um dieno sobre a estrutura do polissacarídeo através da reação com o ácido furóico. A dextrana foi ativada pelo catalisador DMAP. O DMAP é uma base de Lewis que atua na polarização dos grupos hidroxilas da dextrana, permitindo que a carbonila do ácido furóico seja submetida ao ataque nucleofílico pelo grupo hidroxílico da dextrana. Entre diversas rotas de síntese relatadas na literatura para modificação de polissacarídeos, as reações catalisadas com carbodiimidas permitem a formação de ligações de ésteres através de reações com ácido carboxílico. A reação entre um ácido carboxílico e uma carbodiimida tem como produto intermediário a o-acilisouréia. Em meio aquoso este intermediário é instável e pode sofrer hidrólise não formando ésteres. A formação de éster ocorre quando o intermediário o-acilisouréia reage diretamente com uma hidroxila, também produzindo uréia como produto secundário. Um intermediário mais estável em água pode ser obtido a partir da reação entre o-acilisouréia com N-hidroxisuccinamida, o produto da reação deste intermediário com hidroxilas é uma ligação éster, conforme esquema da Figura 18. Para evitar a hidrólise foi utilizada a N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), carbodiimida solúvel em DMSO. O esquema de síntese entre a dextrana e o ácido furóico pode ser observado na Figura 19.

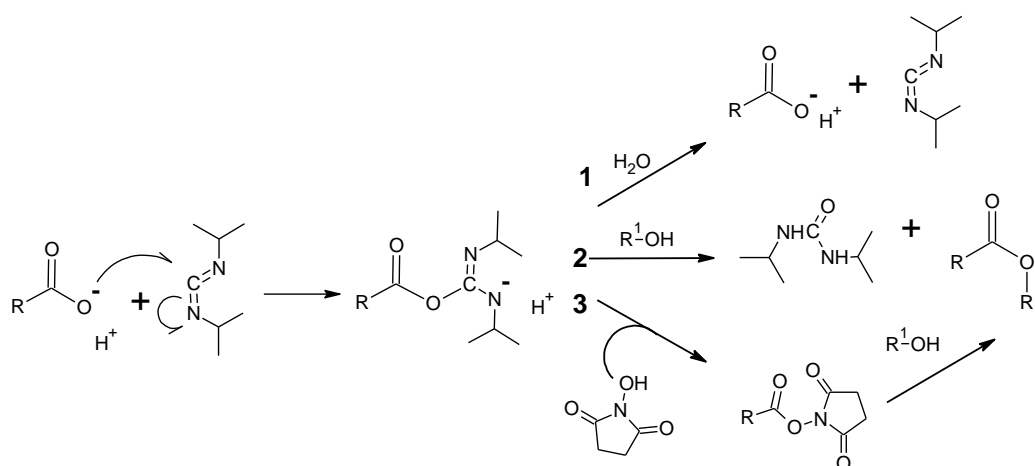


Figura 18. Esquema da reação para obtenção de ésteres utilizando carbodiimida como catalisador. (1) Hidrólise do intermediário o-acilisouréia, (2) Reação direta com hidróxidos e (3) formação de intermediário mais estável através de reação com N-hidroxisuccinamida.

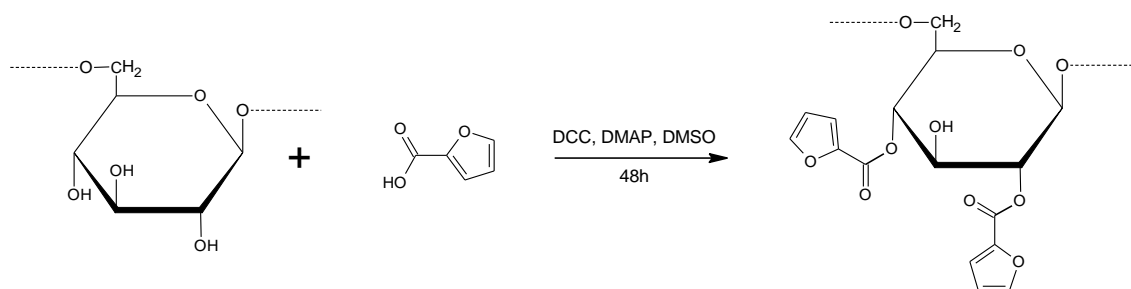


Figura 19. Esquema da reação de modificação da dextrana com ácido furúico.

Os espectros de RMN de ¹H apresentados na Figura 20 são referentes a amostra de dextrana e dextrana modificada. O pico de D₂O correspondente ao solvente está deslocado em 4,69 ppm. Os picos entre 3,10 – 5,20 ppm correspondem a estrutura da dextrana, sendo o próton anomérico correspondente ao deslocamento em 4,98 ppm e a ligação α – 1,4 característica entre as unidades glicosídeas da dextrana correspondentes aos picos compreendidos entre 4,8 – 5,2 ppm. A amostra modificada apresentou picos em 6,64 ppm, 7,26 ppm e 7,72 ppm característicos da presença dos prótons do ácido furúico, confirmando a modificação do polímero. O grau de substituição foi estimado de acordo com a Equação 6, na qual A_{AcF} corresponde a área dos prótons do ácido furúico, A_{Dex} corresponde a área do próton anomérico da dextrana e a razão 1/3 a relação de prótons envolvidos na

integração. O grau de substituição calculado para a amostra Dex_AcF foi de 25%.

$$GS = \frac{1 A_{AcF}}{3 A_{Dex}} \quad \text{Equação 6.}$$

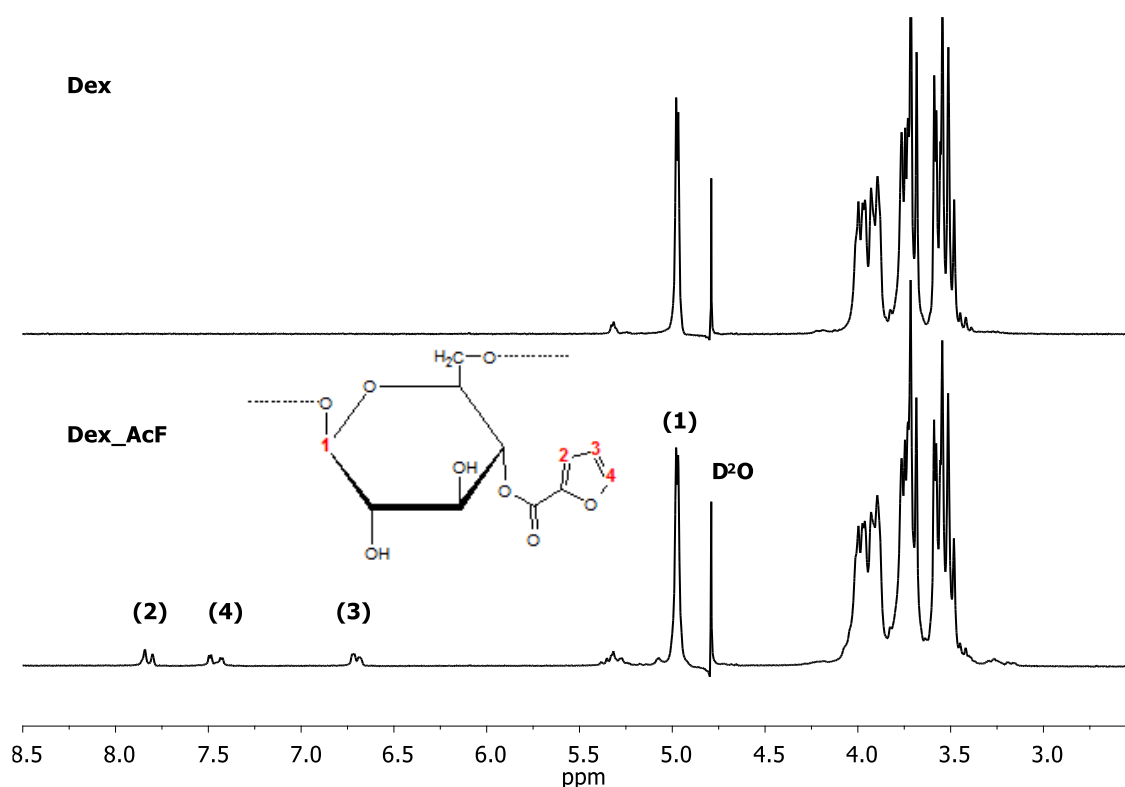


Figura 20. Espectros de ^1H RMN das amostras de dextrana (superior) e dextrana modificada (inferior).

Assim como realizado para a gelatina, a dextrana modificada foi exaustivamente dialisada para remoção do ácido furóico não ligado ao esqueleto do polissacarídeo. A comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C da amostra modificada e sem modificação é apresentada na Figura 21. O carbono anomérico (C1) pode ser observado pelo pico em 98,09 ppm. Os carbonos C2 a C5 apresentam um pico em 72,15 ppm e estão ligados a uma hidroxila. O carbono C6 corresponde ao grupo $-\text{CH}_2$ é identificado pelo pico em 65,46 ppm (63). Os sinais do ácido furóico foram ampliados no espectro da amostra modificada. O C7 corresponde ao átomo de carbono da carbonila em 168,72 ppm. O grupo furano, no qual os sinais em 149 e 143 ppm

correspondem aos carbonos C11 e C8, respectivamente, e os sinais de C9 e C10 são observados em 120 e 113 ppm. O deslocamento dos sinais dos carbonos da dextrana é um indicativo de sua modificação. Nenhum deslocamento foi observado sobre o carbono anomérico, entretanto a deconvolução do sinal ente 74 e 65 ppm, conforme pode ser observado na Figura 22, resulta em pequenos deslocamentos. Os maiores deslocamentos observados são referentes ao C5 e C6, cujos átomos de carbono não possuem hidroxilas ligadas diretamente. Possivelmente estes deslocamentos estão relacionados a deformação estrutural da unidade glicosídica. A intensidade do sinal do C3 é mantido após a modificação, enquanto que as intensidades do C2 e C4 diminuem consideravelmente. Embora sejam necessários estudos mais aprofundados, as hidroxilas ligadas aos C2 e C4 é que atuam no ataque nucleofílico durante a reação como o ácido furóico.

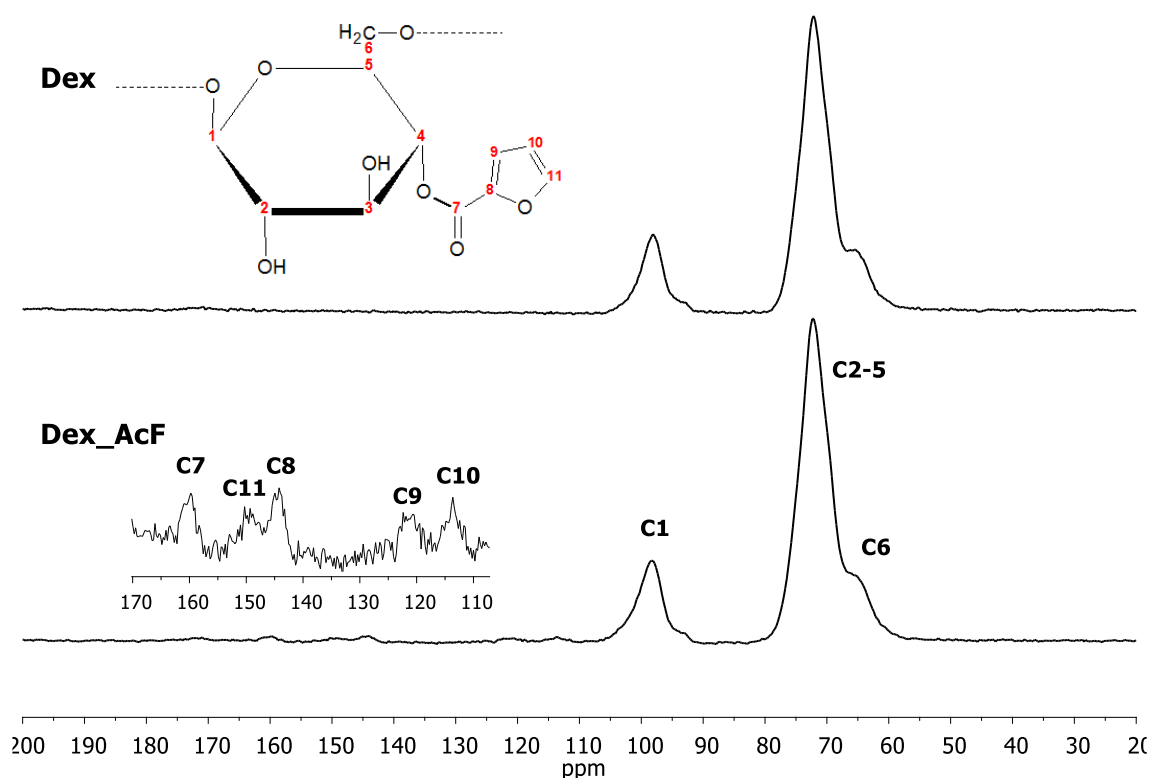


Figura 21. Espectros ^{13}C RMN no estado sólido para amostra de dextrana (superior) e dextrana modificada (inferior).

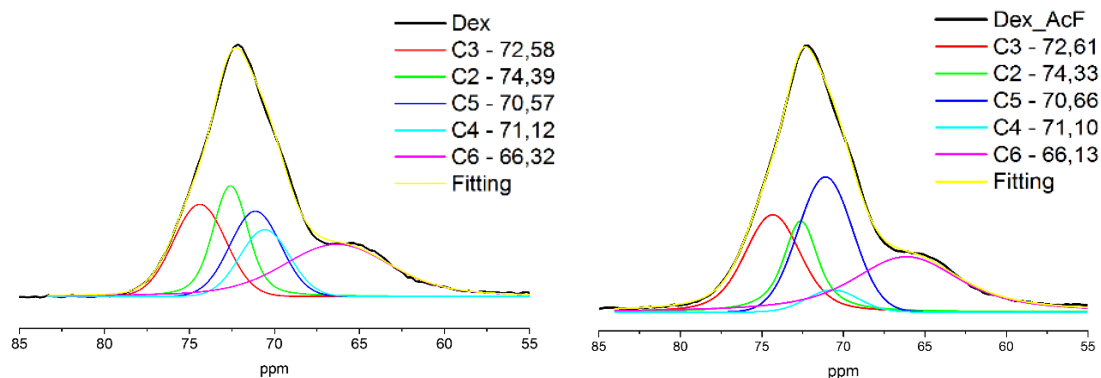


Figura 22. Deconvolução dos espectros ^{13}C RMN no estado sólido para amostra de dextrana (esquerda) e dextrana modificada (direita).

O perfil cromatográfico e os valores de massa molecular para a amostra de dextrana e dextrana modificada podem ser observados, respectivamente, na Figura 23 e Tabela 6. A inserção do ácido furóico não alterou o tamanho da cadeia da dextrana e a análise dos resultados pelo detector UV/Vis não permitiu identificar nenhuma influência do ácido furóico sobre a estrutura do polissacarídeo.

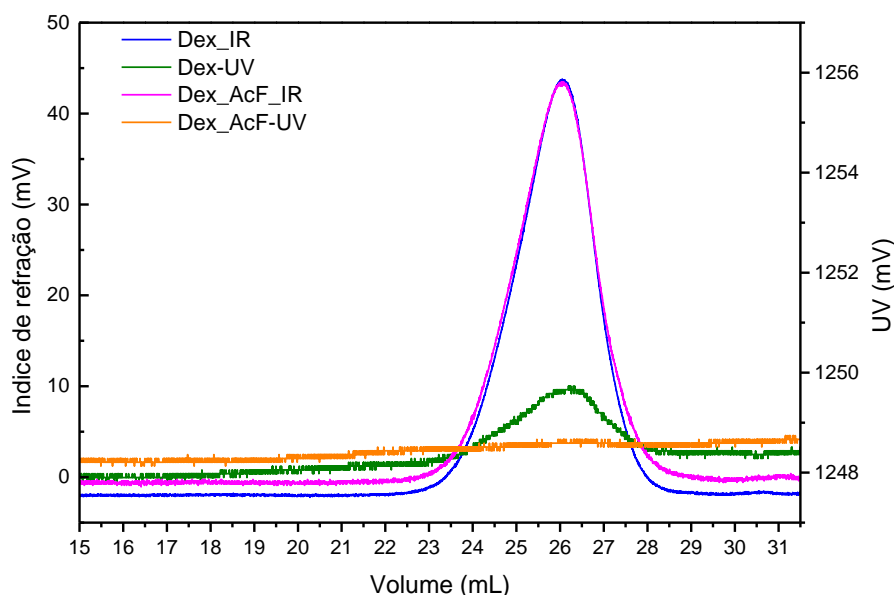


Figura 23. Cromatogramas das amostras de dextrana e dextrana modificada. Comprimento de onda utilizado pelo detector de UV/Vis 300 nm.

Tabela 6. Distribuição das massas molares das amostras de dextrana e dextrana modificada obtida por GPC

Amostras	Mn (g mol ⁻¹)	Mw (g mol ⁻¹)	Mw/Mn
Dex	27600	28100	1,02
Dex_AcF	15600	29400	1,88

4.3. Obtenção e caracterização dos hidrogéis reticulados via reações de Diels-Alder

A gelatina é uma proteína com capacidade de formar um gel elástico em temperatura ambiente. O processo de gelificação está relacionado com a sequência de aminoácido da cadeia de gelatina e a formação de tripla hélice em sua estrutura. Em temperatura elevada, a tripla hélice de aminoácidos é desnaturada e a conformação da gelatina assume uma forma randômica. A medida que a gelatina é resfriada, um processo de renaturação ocorre permitindo que as hélices da estrutura interajam formando zonas de junção em função de ligações de hidrogênio e forças atrativas de van der Waals (64,65). A reticulação da gelatina com ligações covalentes permite alterar a temperatura na qual ocorre a transição sol gel, isto é, um aumento progressivo da viscosidade e o aparecimento de elasticidade. Assim, a gelatina foi modificada para que a reticulação ocorresse por reações click de Diels-Alder. A reação de Diels-Alder corresponde a uma cicloadição extremamente seletiva entre um dieno e um dienófilo na ausência de catalisadores. Na formação do aduto de Diels-Alder não é produzido nenhum subproduto e a reação é acelerada em água devido ao aumento de efeitos hidrofóbicos (21,26). Para uma reação típica, a cicloadição envolve um dieno conjugado rico em elétrons, tal como o ácido furóico, e um dieno pobre em elétrons, como o anel de maleimida, para formar um derivado de ciclohexano, como pode ser observado no esquema da Figura 24.

A reação de formação do aduto de Diels-Alder foi monitorada em função do tempo por espectroscopia UV/Vis. Uma solução de G_MA foi transferida para uma cubeta a uma temperatura de 65 °C e um espectro foi obtido como tempo zero. Na sequência, foi adicionado uma solução de Dex_AcF em concentrações de acordo com as proporções avaliadas e os espectros

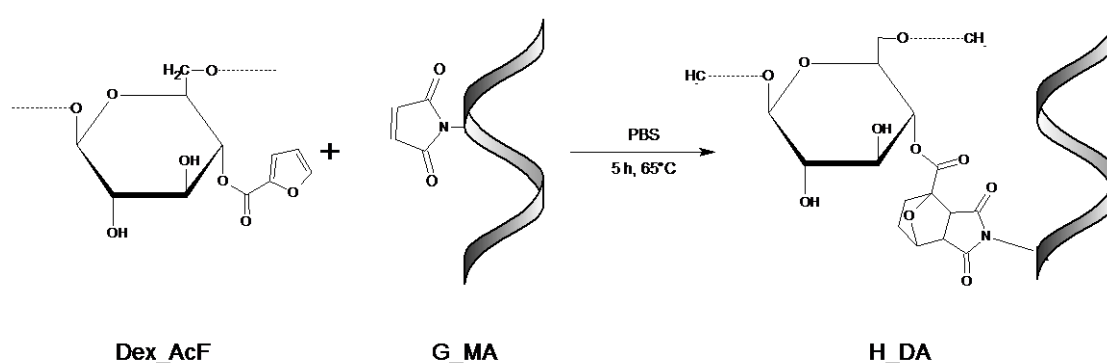


Figura 24. Esquema da formação da reação de Diels-Alder a partir dos polímeros modificados.

registrados a cada 5 minutos durante o período de 5 horas. A formação do hidrogel pode ser acompanhada

pelo decréscimo do sinal em 300 nm de acordo com Gandini et al (66). Nesta região é possível observar a perda da conjugação entre os grupos carbonilas ($\pi^* \text{C}=\text{O}$) e da dupla ligação ($\pi \pi^* \text{C}=\text{C}$) correspondentes ao anel de maleimida (67) que estão envolvidas na formação do aduto de Diels-Alder à medida que a reação de reticulação ocorre. Entretanto, os espectros obtidos não possuem a característica de uma banda de absorção em 300 nm e este resultado pode ser interpretado em função de espalhamento de luz, isto é, a medida com que o hidrogel é formado em função do tempo são criados núcleos do hidrogel que espalham maior intensidade de luz com o crescimento de sua rede tridimensional polimérica, diminuindo, portanto, sua absorção neste comprimento de onda. A Figura 25 apresenta como exemplo os espectros de Uv/Vis das amostras H_DA 1:1. A amostra H_DA 1:1 foi selecionada pois corresponde as quantidades estequiométricas, em função do grau de substituição, de G_MA e Dex_AcF. As quantidades estequiométricas correspondem a presença dos grupos dienos e dienófilo presente em cada um dos polímeros modificados. Este valor foi obtido pela razão entre o grau de substituição dos grupos enxertados e a massa molecular de cada um dos polímeros modificados. O perfil da supressão do sinal em 300 nm em função do tempo para as três composições do hidrogel estudado pode ser observado na Figura 26(A). O aumento da absorção inicial é devido a presença de maior proporção de G_MA na composição do hidrogel variando a velocidade com que cada amostra é reticulada De acordo com a literatura (68), a cinética da reação

de Diels Alder é descrita como uma reação de segunda ordem, com constante de velocidade no valor médio de $3,86 \times 10^{-3} \pm 0,81 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para as amostras de H_DA 1:1 e H_DA 1:3, sendo a amostra estequiométrica a que apresentou melhor correlação (R^2 0,999), conforme a Figura 26 (B). O ajuste da curva da amostra H_DA 3:1 para reação de segunda ordem apresentou correlação muito inferior (0,944), não sendo possível calcular sua constante de velocidade.

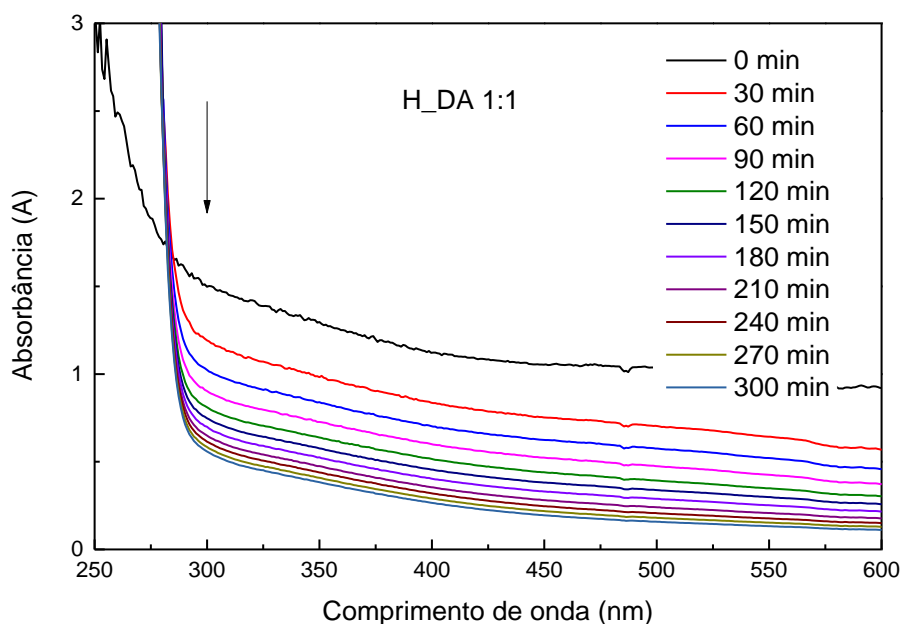


Figura 25. Espectros de UV/Vis da amostra H_DA 1:1 mostrando o avanço da formação do hidrogel reticulados por Diels-Alder

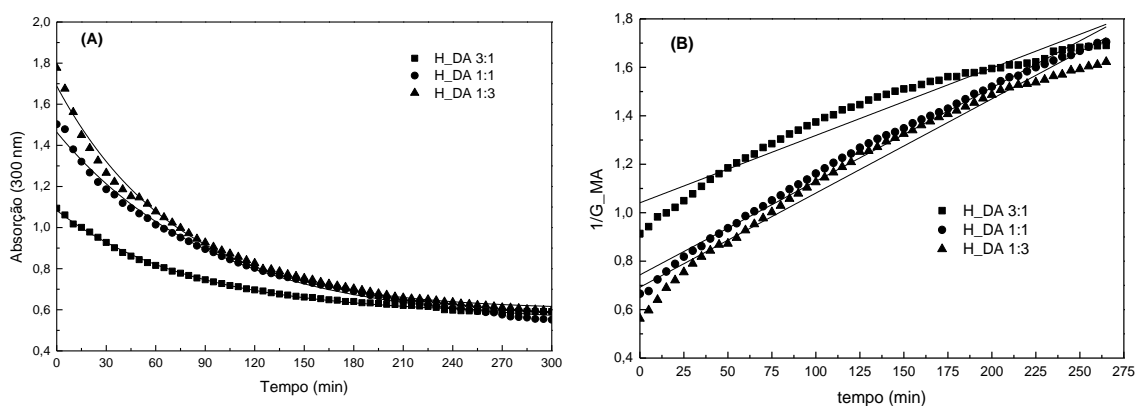


Figura 26. (A) Perfil do consumo do grupo dienófilo durante a reação de Diels - Alder e (B) gráfico de cinética 2ª ordem para reação de Diels – Alder.

As amostras de hidrogel também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura com intuito de avaliar a porosidade dos materiais obtidos. A estrutura porosa é formada após secagem do hidrogel, onde o espaço vazio formado era antes ocupado por moléculas de solvente. O tamanho do poro, bem como sua distribuição e interconectividade afetam a difusão de moléculas bioativa quando o material é aplicado em liberação controlada ou em engenharia de tecidos (69). A Figura 27 apresenta as micrografias e a distribuição dos poros das amostras analisadas. A amostra H_DA 1:3 não apresentou elevada interconectividade entre seus poros, apresentando poços com diâmetro médio de $31,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$. A amostra H_DA 3:1 também não apresentou interconectividade entre os poros, entretanto o diâmetro médio de poro obtido foi de $6,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$, valor mais próximo a amostra H_DA 1:1, cujo valor foi de $7,9 \pm 2,7 \mu\text{m}$. É esperado redução no tamanho dos poros com o aumento de reticulação dos hidrogéis, conforme observado para a amostra obtida em quantidades equimolares de reagentes de Diels-Alder. Quando utilizado excesso de dextrana ou gelatina modificada, a homogeneidade na distribuição dos poros por imagem foi reduzida, alterando a morfologia na superfície dos hidrogéis.

Embora a formação do aduto tenha sido confirmada para as três composições obtidas, as razões estequiométricas utilizadas resultaram em hidrogéis com propriedades distintas, principalmente em relação a sua capacidade de intumescimento. Visando aplicações biomédicas, o controle do intumescimento da matriz de hidrogel pode prever o comportamento da liberação de fármacos em diferentes meios fisiológicos. O intumescimento do hidrogel ocorre quando a matriz polimérica entra em contato com um solvente termodinamicamente compatível. Inicialmente, as moléculas do solvente penetram a superfície porosa do hidrogel, hidratando os sítios mais hidrofílicos, sendo denominado como água de ligação primária. A medida que o hidrogel começa a intumescer, as moléculas do solvente começam a interagir com os grupos mais hidrofóbicos (água de ligação secundária), sendo a soma das hidratações primárias e secundárias denominada como água total. Uma vez que todos os sítios foram hidratados, mais moléculas do solvente são absorvidas pelo hidrogel devido a uma diferença de pressão osmótica gerada pela rede polimérica. O intumescimento atinge seu estado de equilíbrio quando

forças contrárias à pressão osmótica proveniente de ligações covalentes ou eletrostáticas, por exemplo, impedem a expansão entre as cadeias poliméricas (4,9). A Figura 28 apresenta o perfil de intumescimento dos hidrogéis reticulados em diferentes razões estequiométricas. A amostra H_DA 1:1 foi a que apresentou maior capacidade de intumescimento, atingindo o equilíbrio de 340% em cinco horas. O grau de reticulação é o fator mais importante que

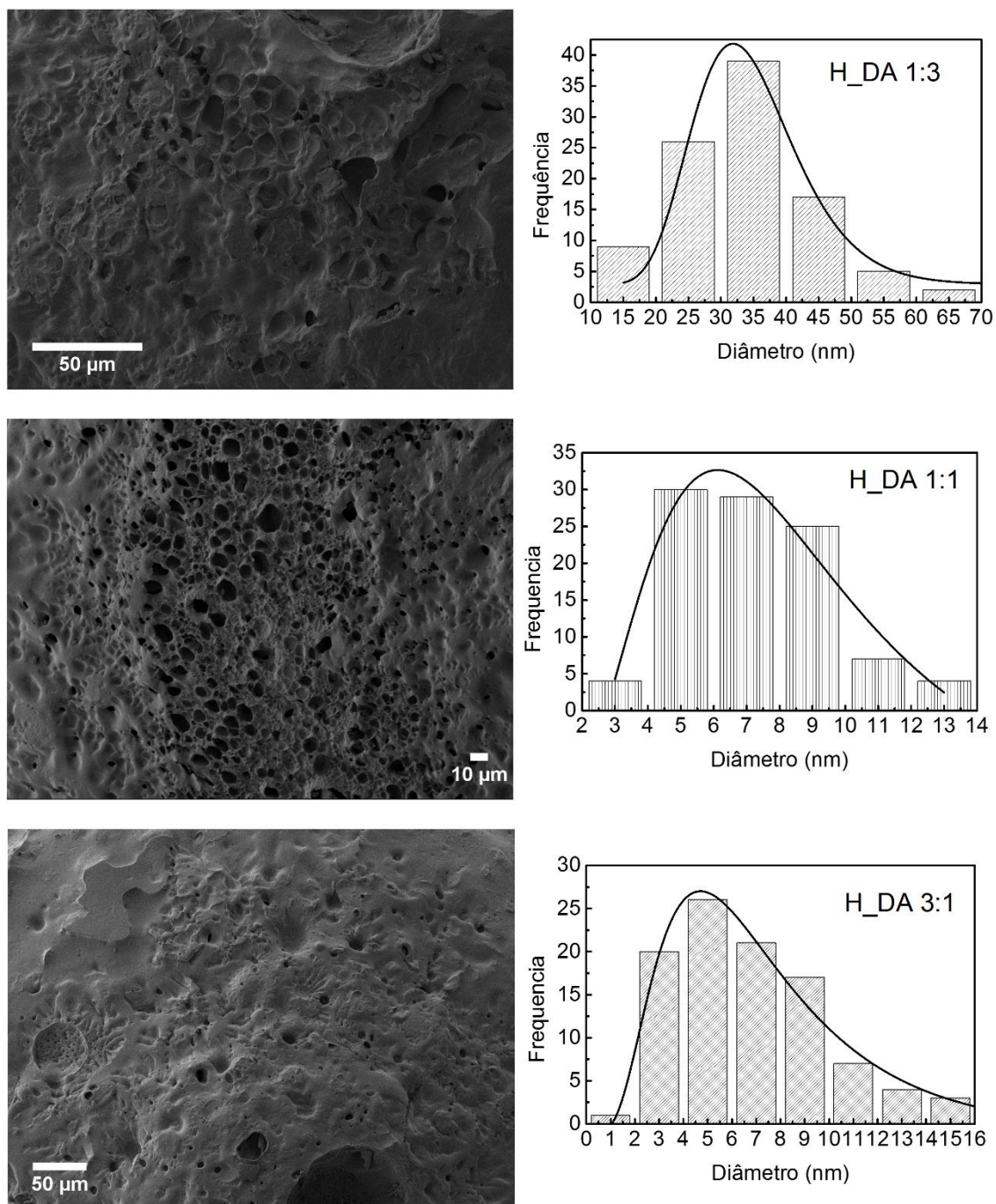


Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura das amostras de hidrogel.

afeta o intumescimento do hidrogel (9) e esta amostra, obtida em condições equimolares dos reagentes de Diels -Alder, é a que, possivelmente, apresenta mais pontos de reticulação em relação as demais amostras. A amostra H_DA 3:1 foi a que apresentou o menor grau de intumescimento, aproximadamente de 50%. A dextrana é um polímero muito hidrofílico que permite rápida absorção de águas primárias, diminuindo o período para se atingir equilíbrio do intumescimento. Após quatro horas de monitoramento a estrutura do hidrogel foi perdida e a amostra dissolvida. Polímeros hidrofílicos apresentam maior intumescimento devido a facilidade de polarização com moléculas de água, entretanto a menor reticulação permitida nesta composição deve ter resultado em cadeias livres de dextrana. Comportamento similar foi obtido para a amostra H_DA 1:3, entretanto o valor do grau de intumescimento antes do colapso foi de 240%. Neste caso, a gelatina é o componente majoritário e apresenta diversos grupos capazes de interagir eletrostaticamente com entre si e com a dextrana, criando pontos de reticulação de origem eletrostática e mais fraco em relação à amostra H_DA 1:1 (70).

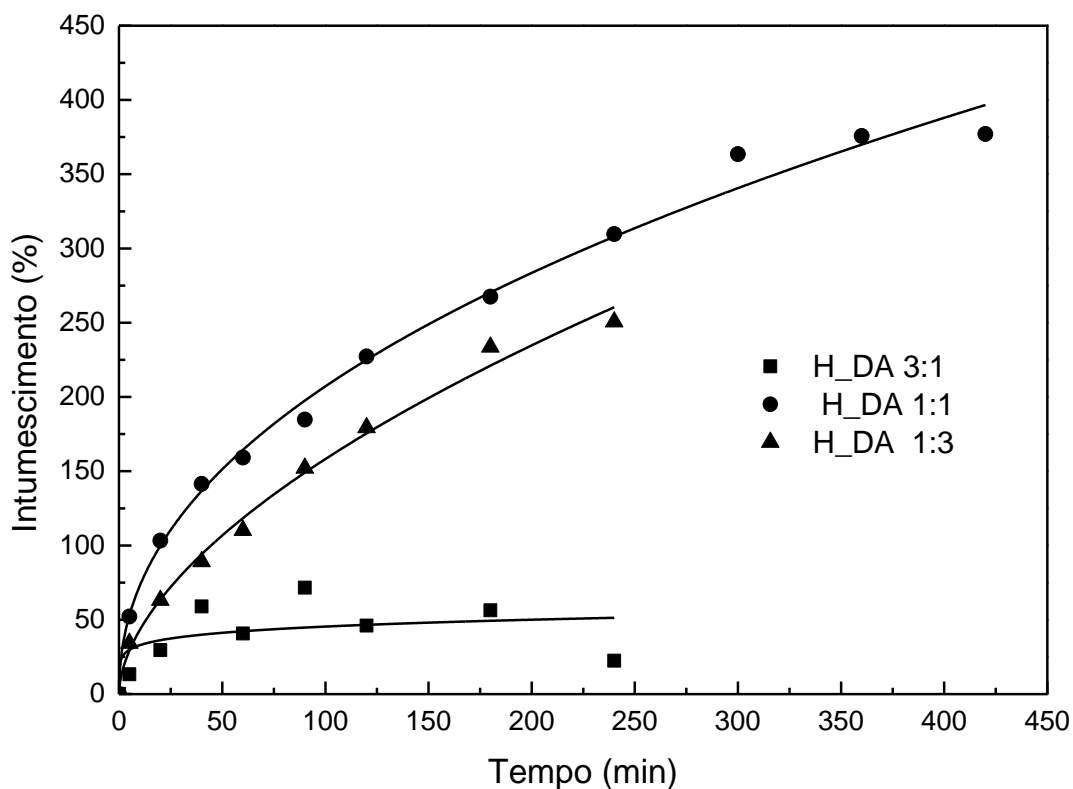


Figura 28. Perfil de intumescimento dos hidrogéis em água.

Em decorrência da baixa capacidade de intumescimento e da microestrutura apresentada pelos hidrogéis obtidos fora da razão estequiométrica, a amostra H_DA 1:1 foi selecionada para dar sequência ao estudo, a qual foi submetida a testes reológicos para caracterizar suas propriedades.

Primeiramente o hidrogel de gelatina não modificada foi submetido a um teste no qual varreu-se a porcentagem de deformação para determinar a região linear de viscoelasticidade do material, isto é, região onde os valores de G' e G'' são independentes da tensão aplicada. A análise da Figura 29 indica que na região linear compreendida entre 0,1 e 1,0% de deformação não há distorções estruturais do hidrogel. Fixando a deformação em 0,1%, foi aplicado teste de frequência sobre o hidrogel de gelatina não modificada e a amostra H_DA 1:1, conforme pode ser observado na Figura 30. O módulo elástico (G') para as amostras é linear para frequências compreendidas entre 100 – 600 rad s⁻¹. Quando a amostra H_DA 1:1 é comparada com a amostra de gelatina à temperatura de 37 °C, o valor de G' é, aproximadamente, superior ao de G'' em quase duas ordens de grandeza, indicando que o hidrogel foi reticulado quimicamente (71,72). O hidrogel reticulado quimicamente é mais rígido e a força necessária para romper uma ligação química é superior a um hidrogel baseado em interações fracas e ligações de hidrogênio. Enquanto a gelatina sem modificação apresenta módulo de armazenamento comparável ao de tecidos como o cérebro e nervos (10^2 – 10^3 Pa), o hidrogel após sua reticulação via reações de Diels-Alder atinge valores próximo aos de tecidos como fígado, gorduras, glândulas mamárias e músculo no estado relaxado, superior em ordem de grandeza dos valores obtidos para a gelatina, permitindo seu uso em engenharia de tecidos (73).

A mesma propriedade reológica da amostra H_DA 1:1 foi avaliada nas temperaturas de 37 °C e 42 °C. Observou que o módulo G'' é superior ao módulo G' em toda a faixa de varredura à 42 °C, ou seja, as características elásticas do hidrogel são suprimidas e o material tornou-se um líquido viscoso.

O caráter termorresponsivo do hidrogel pode ser observado a partir deste comportamento reológico. A 37 °C o hidrogel apresenta estrutura definida, enquanto que a 42 °C as ligações de hidrogênio e interação do tipo van der Waals são rompidas e a interação entre as cadeias poliméricas de

dextrana e gelatina são afastadas, o tornando um líquido viscoso. Embora a ligação covalente da reticulação de Diels-Alder esteja presente na amostra, estas não são suficientes para manter a estrutura de hidrogel. A fotografia da Figura 31 apresenta a variação gel – sol com o aumento da temperatura

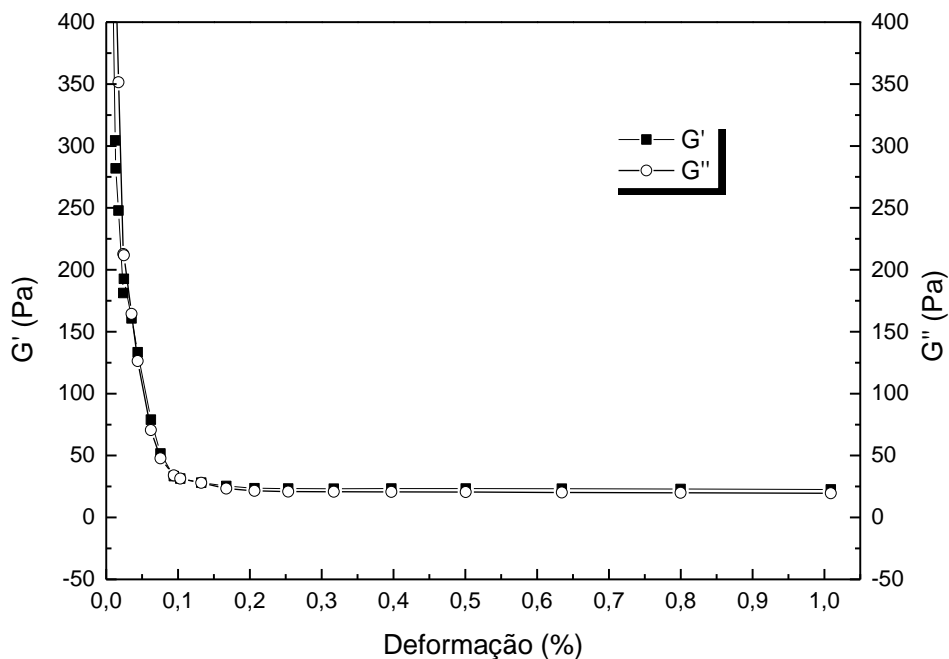


Figura 29. Varredura de deformação para hidrogel de gelatina

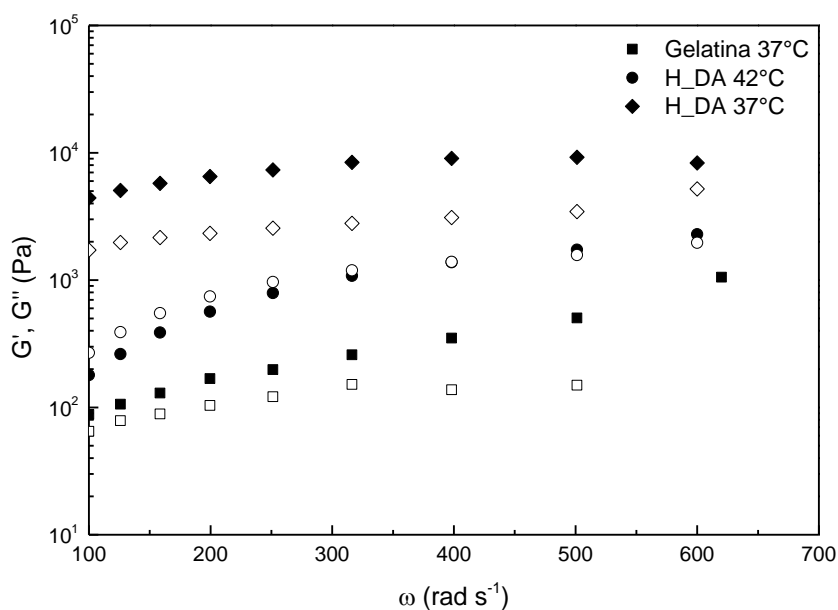


Figura 30. Varredura de frequência para gelatina e hidrogel de gelatina reticulado por reações de Diels – Alder. G' – símbolo fechado. G'' – símbolo aberto.



Figura 31. Efeito da temperatura na transição sol – gel

Apesar da diferença de temperatura ser de apenas 5 °C, estes valores são desejáveis visando aplicações em biomedicina. À 37 °C o hidrogel obtido pode ser empregado em engenharia de tecido pois sua estrutura mantém-se estável à temperatura do corpo humano. O tecido quando é acometido por alguma patologia reage com aumento de temperatura. Aumento moderado de temperatura (entre 41 e 46 °C) resulta em sérios prejuízos a vários componentes celulares, tais como membrana, citoesqueleto, síntese de macromoléculas ou ainda reparos na fita do DNA, causando degradação celular e, conseqüentemente, apoptose destas células. Por encontrar-se no estado sol a 42 °C, a amostra H_DA 1:1 pode ter seu fármaco facilmente liberado nestas temperaturas em função da mudança conformacional do hidrogel, causado por efeitos endógenos ou exógenos (53,74).

O intumescimento do hidrogel foi avaliado em diferentes meios, tais como água, tampão fosfato (PBS) e em solução de ácido clorídrico (pH 2), simulando os fluídos gástricos estomacais (GFS). O perfil de intumescimento foi similar para todos os meios estudados, no entanto o equilíbrio foi estabelecido em porcentagens diferentes, conforme pode ser observado na Figura 32. A capacidade de intumescimento do hidrogel em água foi de 377%, enquanto que em PBS e GFS foi de 458% e 641%, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado em função das cargas na superfície da gelatina, quando comparamos os resultados de intumescimento com a curva de titulação de potencial Zeta apresentada na Figura 16. No ponto isoelétrico a gelatina modificada apresenta sua menor capacidade de intumescimento e isto está relacionado a perda de ligação de hidrogênio entre as cadeias poliméricas. Abaixo do ponto isoelétrico os grupos amins da estrutura da gelatina estão

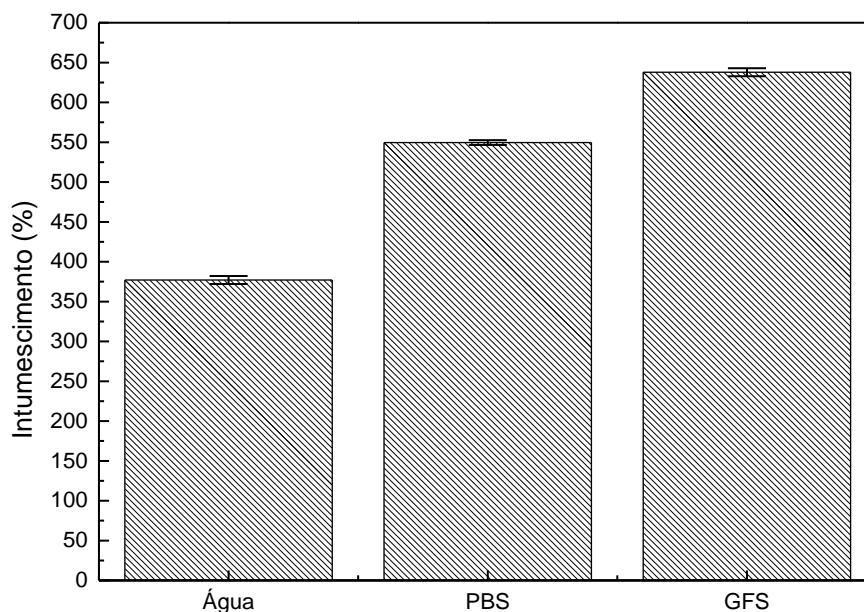


Figura 32. Equilíbrio de intumescimento de hidrogel em vários fluidos

protonados e a repulsão entre as cadeias do gel são maiores, justificando o maior intumescimento para a amostra absorvida com GFS. No caso do hidrogel intumescido com PBS, a amostra encontra-se acima do seu ponto isoelétrico e os grupos carboxílicos desprotonados são responsáveis pela repulsão entre as cadeias (33,75). O fato do intumescimento em PBS ser menor pode ser decorrente do seu menor valor de potencial zeta, quando comparado os potenciais em cada faixa de pH.

O mecanismo de intumescimento dos hidrogéis foi estudado a partir da absorção de fluidos proposta por Peppas et al (12). A fração (F) de solvente absorvido pelo hidrogel em função do tempo pode ser descrita pela Equação 7, na qual m_t corresponde a massa do hidrogel no tempo t , m_0 corresponde a massa do hidrogel seco e m_e a massa do hidrogel intumescido no equilíbrio. A constante k é referente a velocidade de intumescimento, enquanto o expoente n descreve o mecanismo de intumescimento de acordo com a forma geométrica do hidrogel, conforme os valores apresentados na Tabela 2.

$$F = \frac{m_t - m_0}{m_e - m_0} = kt^n \quad \text{Equação 7}$$

$$\log F = \log k + n \log t \quad \text{Equação 8}$$

A equação 7 pode ser linearizada aplicando as propriedades logarítmicas em ambos os lados da equação, de forma que o expoente n pode ser obtido pelo coeficiente angular da reta e a constante de velocidade pela potência do coeficiente linear, conforme indicado na Equação 8. Os gráficos de \log de F em função de \log do tempo são apresentados na Figura 33 e os valores obtidos pela linearização podem ser observados na Tabela 7. Embora os líquidos utilizados modifiquem a capacidade de absorção do hidrogel, o mecanismo de intumescimento é o mesmo para todas as amostras analisadas. Os valores de expoente n estão compreendidos na faixa correspondente ao mecanismo de transporte anômalo. Neste tipo de mecanismo é observado transporte de solvente decorrente de processos difusionais provocado por diferença de pressão osmótica, bem como processos de relaxação das cadeias poliméricas que compõe o hidrogel (12). Os valores da constante de velocidade calculado estão próximos para os fluidos analisados, indicando que atingem equilíbrio de intumescimento de forma equivalente.

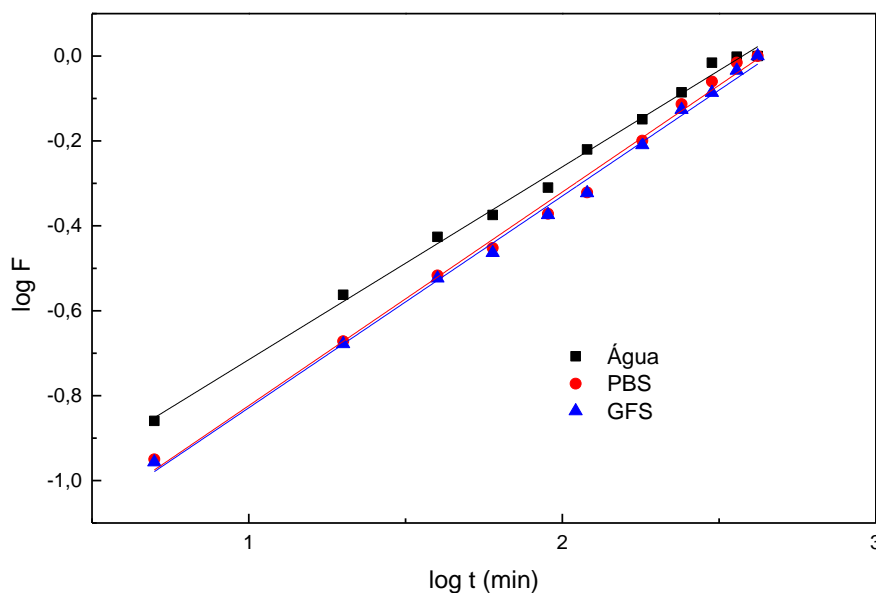


Figura 33. Curva bi-logarítmica da fração de solução absorvida em função do tempo para diversos fluidos.

Tabela 7. Parâmetros obtidos da curva cinética de intumescimento dos hidrogéis.

Amostra	n	k (min ⁻¹)	R
Água	0,46	0,067	0,998
PBS	0,50	0,047	0,997
GFS	0,50	0,047	0,998

4.4. Liberação de diclofenaco de potássio da matriz de hidrogel

A espectroscopia UV-Vis foi utilizada para quantificar a concentração de diclofenaco de potássio no estudo de liberação do fármaco hidrofílico no hidrogel. O espectro de absorção obtido (Figura 34) apresenta uma única banda característica em 276 nm. A direita da Figura 34 apresenta a curva analítica obtida a partir de concentrações conhecidas de diclofenaco de potássio, resultando em uma reta cujo valor de absorvidade molar obtido foi de 0,0049 L μmol^{-1} cm⁻¹, com coeficiente de correlação linear de 0,9996.

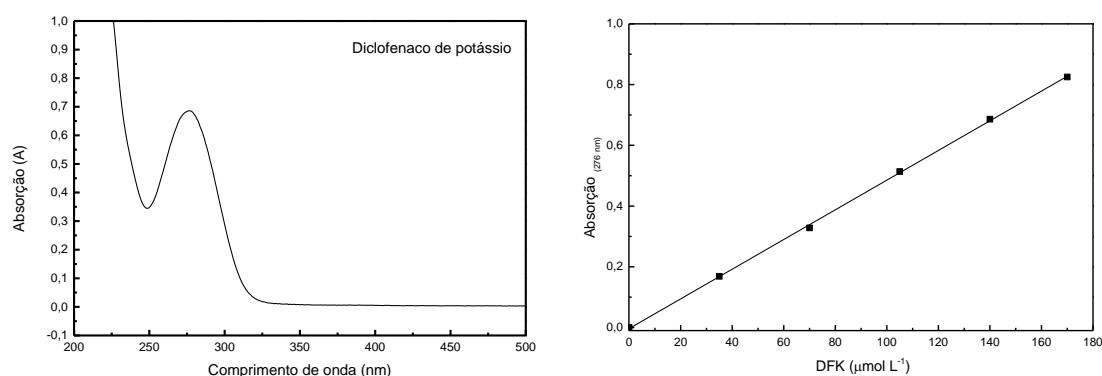


Figura 34. Espectro Uv/Vis do fármaco diclofenaco de potássio(esquerda) e curva analítica da amostra obtida em PBS (PBS).

O perfil de liberação de diclofenaco de potássio foi monitorado em água, tampão fosfato e simulado de fluido gástrico a fim de comparar os resultados com o estudo de intumescimento dos hidrogéis. A Figura 35 apresenta a porcentagem de diclofenaco liberado em função do tempo. É possível observar que o comportamento foi similar nos primeiros 30 minutos de monitoramento

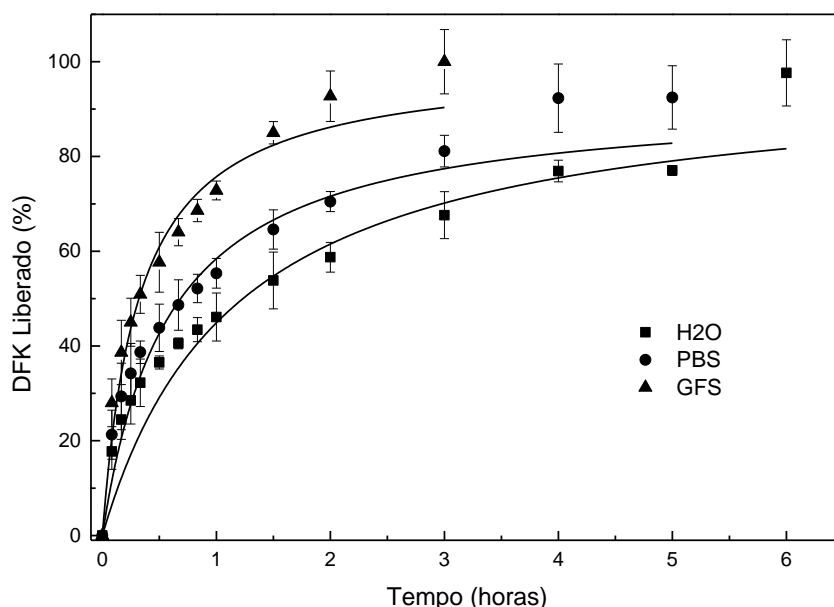


Figura 35. Perfil de liberação de diclofenaco de potássio em diferentes meios de dissolução.

para todos os meios estudados. Neste período inicial foi liberado aproximadamente 30,0% do fármaco presente no hidrogel, o que a literatura relata como *burst effect*. Este efeito corresponde a uma elevada taxa de liberação, mas ainda não é totalmente compreendido, podendo estar relacionado com alta concentração de fármaco na superfície da matriz de hidrogel e com a geometria do sistema de liberação (76,77). Após este período, o perfil da curva é alterado para cada meio de dissolução utilizado e a liberação total de diclofenaco de potássio é atingida em tempos distintos. A liberação foi mais lenta quando a matriz de hidrogel foi testada em água, atingindo o máximo de liberação após seis horas do início do monitoramento. Quando utilizado PBS como meio, a liberação foi completa após cinco horas de análise e, ao utilizar o GFS como meio de liberação, o tempo para se atingir o máximo de diclofenaco liberado foi reduzido para três horas. Este comportamento pode estar relacionado a capacidade de intumescimento do hidrogel. O GFS foi o meio no qual o equilíbrio de intumescimento foi superior ao demais meios estudados e que teve sua liberação alcançada mais rapidamente. Isto por que a concentração do fármaco no interior da matriz de hidrogel e no meio de solução tem seu equilíbrio alcançado mais rapidamente a medida que mais líquido é absorvido pelo material, favorecendo uma liberação rápida. Observa-se

que o diclofenaco de potássio é um fármaco solúvel em água e que sua interação como a matriz de hidrogel não é forte, uma vez que todo o fármaco foi liberado para o meio avaliado.

A Figura 36 apresenta a curva de cinética da fração diclofenaco de potássio liberado utilizando o modelo de Kosmeyer-Peppas e a Tabela 8 resume os parâmetros extraídos da linearização das curvas de liberação. A linearização foi mantida por toda a faixa de liberação, apresentando excelente coeficiente de correlação para todas as amostras. A alta solubilidade do diclofenaco em água pode ser observada a partir dos valores de constante de velocidade de liberação obtidos. As constantes obtidas nesta etapa são superiores aos valores observados para o intumescimento do hidrogel em até 3,5 vezes, uma vez que o fármaco é dissolvido no momento da solvatação dos sítios hidrofílicos do hidrogel. O mecanismo de liberação do diclofenaco sobre a matriz de hidrogel segue a lei de difusão de Fick, uma vez que o valor do expoente n obtido (aproximadamente 0,36) para todos os meios está abaixo do limite proposto por Peppas et al (12). Embora o intumescimento prevê difusão e relaxação das cadeias poliméricas do hidrogel, a liberação rápida do diclofenaco não é governada por estes processos de relaxação.

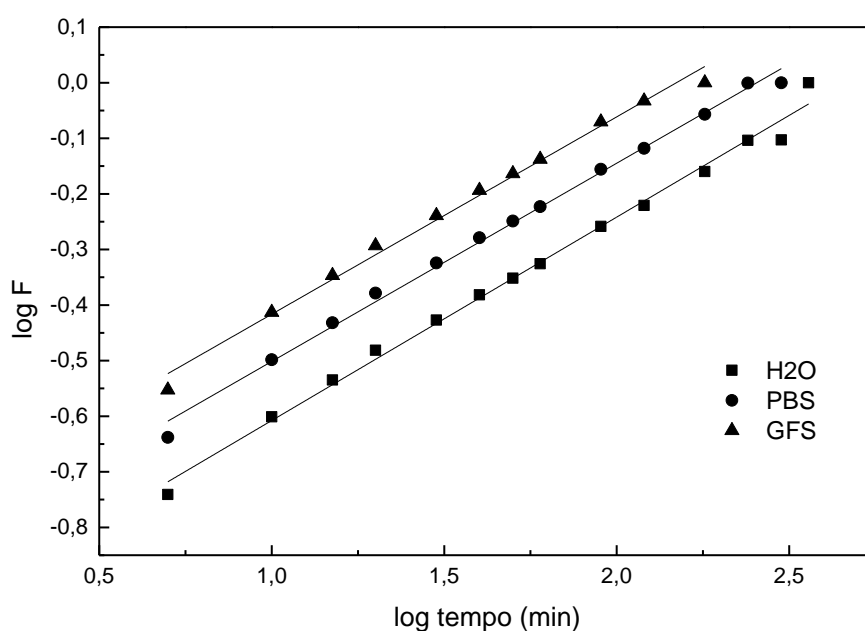


Figura 36. Curva bi-logarítmica da fração de diclofenaco liberado em função do tempo para diversos fluidos.

Tabela 8. Parâmetros obtidos da curva cinética de liberação de diclofenaco dos hidrogéis.

Amostra	n	k (min ⁻¹)	R ²
Água	0,36	0,106	0,996
PBS	0,36	0,138	0,997
GFS	0,35	0,169	0,996

5. Conclusões parciais

A inserção de grupos dienos e dienófilo sobre as estruturas poliméricas de gelatina e dextrana foi realizada através da modificação por anidrido maleico e ácido furóico, respectivamente. Com a presença destes grupos foi possível reticular quimicamente os hidrogéis por reações de Diels-Alder. Foram obtidos hidrogéis com diferentes razões molares de grupos dienos e dienófilo, entretanto o que apresentou melhor capacidade de intumescimento foi empregando quantidades equimolares dos reagentes de Diels-Alder. O perfil de intumescimento e o mecanismo cinético foram estudados em água, tampão fosfato e simulado de fluido gástrico. O simulado de fluido gástrico foi o meio de dissolução que resultou em maior intumescimento do hidrogel, devido as repulsões provocadas pelo grupo aminas protonados na estrutura de gelatina, entretanto o mecanismo de transporte anômalo foi observado para todas as soluções estudadas. O diclofenaco de potássio foi utilizado como modelo de fármaco hidrofílico para condução dos estudos de liberação. A liberação de diclofenaco segue o mecanismo de difusão Fickiana para os mesmos meios estudados no intumescimento. A liberação mais lenta foi observada quando água foi utilizada como meio de dissolução do fármaco, no qual após seis horas de monitoramento foi alcançada sua liberação máxima de diclofenaco de potássio.

Capítulo 2

Nanopartículas de mPEG-co-PCL para liberação controlada de Metotrexato

1. Introdução

1.1. Fármacos hidrofóbicos

A descoberta de novas moléculas com atividade biológica é crescente nas últimas décadas. No entanto, a maioria destas moléculas apresentam baixa solubilidade em ambientes hidrofílicos como o corpo humano, inviabilizando seu uso como fármacos. Estima-se que 70% das moléculas com atividade biológica recém descobertas sejam pouco solúveis em água (78). É desejável que, além da solubilidade em água, as moléculas bioativas apresentem permeabilidade nos tecidos. Considerando estas propriedades, foi criado o sistema de classificação biofarmacêutica, no qual os fármacos são classificados quanto a sua velocidade e a extensão da absorção pelo organismo, pela sua dissolução e permeabilidade no tecido em questão (10), conforme apresentado na Tabela 9.

Os critérios para elaboração da classificação biofarmacêutica foram estabelecidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA), baseado na maior dose de fármaco imediatamente liberada. Assim, um fármaco é considerado muito solúvel quando é solubilizado em 250,0 mL – ou menos – de um meio aquoso com valor de pH compreendido entre 1,0 e 7,5. Se o fármaco não atender estas especificações é considerado pouco solúvel. O teste de permeabilidade é baseado na absorção intestinal do fármaco, através de medidas na razão de transferência de massa por membrana intestinal humana ou em animais modelos. O fármaco apresenta alta permeabilidade quando atinge valores acima de 90% (79). Apesar dos fármacos pertencentes a classe IV desta classificação não apresentarem nenhuma atratividade de uso pela indústria farmacêutica, estes não devem ser ignorados. Uma variedade de sistemas de liberação de fármacos tem sido estudada pela comunidade científica nas últimas décadas para aumentar a solubilidade e permeabilidade destes fármacos. A estratégia utilizada para contornar o efeito da baixa

solubilidade destas moléculas bioativas consiste em utilizar nanoplataformas, tais como as nanopartículas, lipossomas ou micelas poliméricas, na qual o fármaco pouco solúvel é solubilizado em reservatórios hidrofóbicos, aumentando sua biodistribuição no organismo (10, 12). Independente do fármaco ser administrado como solução ou encapsulado por carreadores é importante que estes consigam atingir o sítio de ação. Uma breve descrição das barreiras fisiológicas será apresentada na seção seguinte.

Tabela 9. Classificação biofarmacêutica de fármacos com base na sua aplicação (74).

Classe I	Classe II
Elevada solubilidade	Baixa solubilidade
Elevada permeabilidade	Elevada permeabilidade
Classe III	Classe IV
Elevada solubilidade	Baixa solubilidade
Baixa permeabilidade	Baixa permeabilidade

1.2. Barreiras fisiológicas

As barreiras fisiológicas existem para proteger o organismo de corpos estranhos, incluindo as moléculas bioativas que são administradas para combater algum efeito patológico. A administração de agentes terapêuticos sempre foi limitada por fatores tais como a baixa estabilidade e solubilidade no interior do corpo humano seguido de uma rápida eliminação. A consequência da baixa circulação e, portanto, pouca eficiência dos tratamentos muitas vezes foi contornada com o aumento da concentração da molécula bioativa no sangue. Com este aumento, surge efeitos colaterais nos pacientes além de dificultar a formulação de remédios com alta eficiência de encapsulação aumentando, assim, o custo da produção (10). A conjugação de moléculas bioativas com polímeros biocompatíveis melhorou substancialmente o tempo de circulação na corrente sanguínea, além de diminuir os efeitos colaterais. Assim, os nanocarreadores poliméricos não devem apresentar toxicidade ou

efeitos imunogênicos, além de transportar uma quantidade suficiente de molécula bioativa para liberação em local específico no corpo humano.

A primeira barreira fisiológica que uma nanopartícula enfrenta é a rota de administração no paciente, seja por via oral, respiratória ou injeção intravenosa. A injeção intravenosa é a rota que apresenta maior reprodutibilidade, uma vez que o fármaco é transportado para o coração através do sangue e distribuído para o resto do corpo humano. Todo o fluxo sanguíneo no coração passa pelos pulmões, cujos vasos capilares correspondem aos menores vasos sanguíneos do corpo humano, com diâmetro compreendido entre 2 e 13 μm e, portanto, constituem as primeiras restrições de passagem de partículas. As partículas com diâmetro de 3-6 μm são aprisionadas nos capilares pulmonares, mas, devido a deformações de vasos, as partículas menores que 3 μm alcançam a circulação. Embora os nanocarreadores estejam ordens de grandeza abaixo da escala de tamanho do capilar, a instabilidade físico-química e a interação das nanopartículas com proteínas presente no sangue não devem ser negligenciadas e podem restringir a circulação destes materiais pelo sistema circulatório (80). Após passagem pelo pulmão, os nanocarreadores voltam para o coração e são bombeados para os demais órgãos do corpo, onde enfrentam novas barreiras. Assim como no pulmão, os nanocarreadores são filtrados em função do tamanho de acordo com a fenestra encontrada no epitélio de cada tecido: o rim retém nanopartículas superiores a 60 – 80 nm, enquanto o fígado e o baço são capazes de filtrar partículas compreendidas entre 100 – 150 nm e 200 nm, respectivamente, de acordo com a espécie animal em questão. Proteínas presentes no sangue também são responsáveis pela eliminação de partículas estranhas, eliminadas por sistema de fagocitose, tal como as opsoninas. A fagocitose ocorre após sucessivo contato dos macrófagos da membrana celular com corpos estranhos presentes no sangue, internalizando-os. Após internalização, as partículas são digeridas por proteínas e pelo meio ácido intracelular, sendo eliminadas por exocitoses após degradação ou sequestrada por corpos residuais se as células não forem capazes de metabolizar as partículas. A fagocitose consegue eliminar corpos compreendidos entre 100 e 200 nm de diâmetro (80–82)

A carga de superfície também se destaca como importante parâmetro físico químico capaz de alterar a circulação de nanocarreadores pelo organismo. Superfícies carregadas podem alterar o perfil de opsonização das partículas, devido ao reconhecimento por células do sistema de fagocitose, alterando sua circulação pelo plasma (83). As superfícies carregadas negativamente não apresentam uma resposta linear quanto a sua eliminação por fagocitose, podendo aumentar, diminuir ou não sofrer nenhum tipo de impacto durante sua remoção do fluxo sanguíneo, por outro lado os carreadores positivamente carregados apresentam rápida eliminação quando exposto ao plasma sanguíneo. Este comportamento deve-se a interação eletrostática entre o carreador e a membrana celular, cuja carga é negativa em função da camada de fosfolípídeos (83)

A partir da compreensão dos sistemas biológicos foi possível aprimorar a engenharia de superfícies dos nanocarreadores através do controle das propriedades físico químicas, superando as barreiras biológicas e aumentando a biodistribuição na corrente sanguínea. Além disso, diversas estratégias foram criadas para aumentar a internalização dos nanocarreadores em tecidos não saudáveis, tais como células tumorais. Utilizando o modelo do cavalo de Tróia, moléculas bioativas foram encapsuladas por nanocarreadores cuja superfície foi funcionalizada de forma a não serem eliminadas por fagocitose e conseguissem internalização em tecidos não saudáveis (84). É o caso do polietileno glicol (PEG), cujos resultados mostram redução das interações não específicas com as proteínas do sangue, devido a sua hidrofiliabilidade e estabilidade causada por repulsão estérica, permitindo sua conjugação direta com as moléculas bioativas ou pela funcionalização na superfície de nanopartículas (81,85).

A internalização de carreadores de fármacos em tecidos tumorais ocorre em função da presença de fenestras nos vasos sanguíneos e da baixa remoção de metabólitos pelos linfócitos. A combinação destes dois fenômenos foi denominada como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês *enhanced permeation and retention effect*). A vascularização anormal observada em tecidos tumorais é decorrente da falta de oxigênio para suprir o funcionamento adequado das células. Tendo início a morte celular, estas

excretam fatores de crescimento que resultam no crescimento descontrolado de capilares para atender a demanda de oxigênio. Este processo, chamado de angiogênese, resulta na formação de vasos sanguíneos irregulares e, conseqüentemente, formação descontínua do epitélio, com formação de fenestras da ordem de 200 a 2000 nm, de acordo com o tipo de tumor e sua localização. A reprodução desordenada das células favorece o aumento de permeação de carreadores no efeito EPR. O aumento de retenção também é consequência da reprodução desordenada de células. Enquanto em tecidos normais a drenagem de fluído extracelular é constante, permitindo a remoção contínua de partículas e macromoléculas, a função linfática se apresenta defeituosa para tecidos tumorais. Assim as partículas são acumuladas nos interstícios das células tumorais ao invés de retornarem para a corrente sanguínea (83).

1.3. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas podem ser definidas como partículas coloidais com tamanhos compreendidos entre 10 e 1000 nm. O termo nanopartículas é genérico e engloba as nanocapsulas e as nanoesferas. As nanoesferas correspondem a uma matriz sólida no qual outras moléculas podem estar adsorvidas em sua superfície ou encapsuladas no seu interior. Já as nanocapsulas podem ser tratadas como sistemas vesiculares, no qual moléculas podem estar dissolvidas na cavidade líquida interior.

Diversos métodos são empregados na obtenção de nanopartículas poliméricas e a escolha deve ser baseada no tipo de aplicação, no tipo de sistema polimérico utilizado e, principalmente, o tamanho de nanopartículas desejado (86). Os principais métodos relatados pela literatura são classificados em dois grupos: as nanopartículas provenientes de polímeros já sintetizados ou pela polimerização direta de monômeros, como estão resumidos na Figura 37.

A evaporação por solvente foi a primeira técnica empregada para preparar nanopartículas poliméricas a partir de polímeros já sintetizado, desenvolvida por Vanderhoff et al (87). A técnica consiste no preparo de uma emulsão óleo/água, na qual a fase óleo seja composta de um solvente volátil capaz de solubilizar o polímero e a fase aquosa uma solução de surfactante.

Se empregados homogenizadores do tipo rotor estator (turrax) ou ultrassom para a obtenção de nanopartículas, que são formadas à medida que o solvente se difunde pela fase contínua da emulsão, podendo ser separada por centrifugação ou filtração (88).

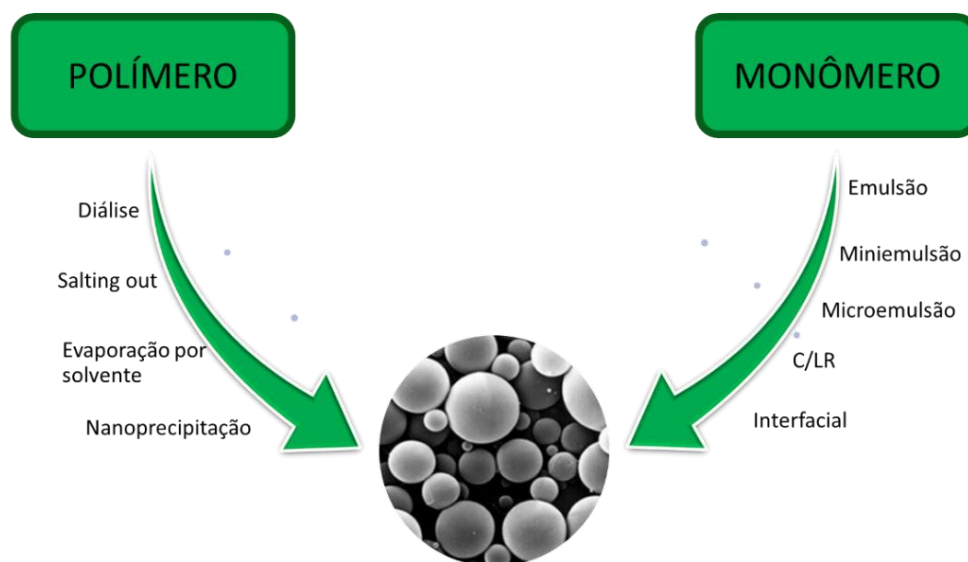


Figura 37. Representação esquemática das principais técnicas para obtenção de nanopartículas poliméricas. Adaptado de (86).

Embora o método da evaporação por solvente seja de fácil execução, diversos fatores podem ser ajustados para obtenção de nanopartículas com controle de tamanho. Em seu artigo de revisão, Rao et al (86) resumiu que nanopartículas poliméricas obtidas por este método possuem diâmetros compreendidos entre 60 a 300 nm, de acordo com o solvente e o surfactante empregado no preparo das nanopartículas. Eles observaram que o aumento da concentração de polivinil álcool como agente de superfície diminui o tamanho das nanopartículas obtidas para o caso de emulsões simples do tipo água em óleo. Os dispositivos de homogeneização também resultam em dispersões de nanopartículas com tamanhos variados. A interface água/óleo é criada em função do tipo de homogeneizador empregado na obtenção das nanopartículas. Quando utilizado rotor estator, o tamanho de gota da emulsão é formado a partir da geometria do sistema, no qual tem-se menores partículas com a diminuição do rodaminho formado durante a agitação do sistema.

Sonificadores produzem ondas de ultrassom que causam oscilações nas moléculas a medida que as ondas são propagadas. Durante os ciclos de compressão e rarefação a distância entre as moléculas diminuem e aumentam, respectivamente, causando um colapso das gotas de monômero devido as sucessivas fusões e fissões. Dessa forma, o sistema de homogeneização é capaz de fornecer um máximo de energia para reduzir ao máximo o tamanho e a polidispersão das nanopartículas (89,90). Bilati et al (91), estudaram a influência do tempo e da potência do uso de ultrassom em sistemas duplos de emulsão, sugerindo a existência de um limite máximo de energia que o ultrassom consegue diminuir o tamanho das nanopartículas do sistema.

Considerando apenas os dois fatores supracitados, o aumento da intensidade de homogeneização resulta em partículas com tamanhos menores que, por outro lado, mais agente de superfície se faz necessário para estabilização da emulsão. Isto mostra a complexidade do método da evaporação por solvente no que se refere a controle do tamanho de nanopartículas. Assim evitar a coalescência ou a maturação de Ostwald torna-se uma tarefa exaustiva ao observar um resumo dos principais fatores que influenciam a formação de nanopartículas pelo método da emulsão por evaporação de solvente, conforme ilustrado no diagrama da Figura 38.

O estudo de nanoplateformas para liberação de fármacos pouco solúveis pode ser dividido em três fases. Na primeira geração de plataformas os estudos se concentraram no desenvolvimento de materiais com elevada incorporação de fármacos e que apresentasse solubilidade em água e boa compatibilidade. A primeira geração não obteve o devido sucesso pois as nanoplateformas eram rapidamente eliminadas do corpo e não apresentavam estabilidade coloidal quando dispersas em fluídos biológicos. Estes resultados alteraram o foco das pesquisas para melhorar a estabilidade e o tempo de circulação das nanoplateformas na corrente sanguínea. A segunda geração de plataformas mostrou que diversos nanomateriais alcançavam estabilidade coloidal após a funcionalização da superfície com PEG. O PEG foi exaustivamente estudado por ser um dos poucos polímeros sintéticos aprovados pelo FDA para uso em produtos farmacêuticos. Além de não apresentar toxicidade, o PEG é rapidamente hidratado e pode ser facilmente

funcionalizado à superfícies, reduzindo etapas complicadas de síntese (78). A terceira geração de materiais corresponde as nanopartículas que apresentam propriedades responsivas, tais como as citadas na seção 1.6 do capítulo anterior (92).

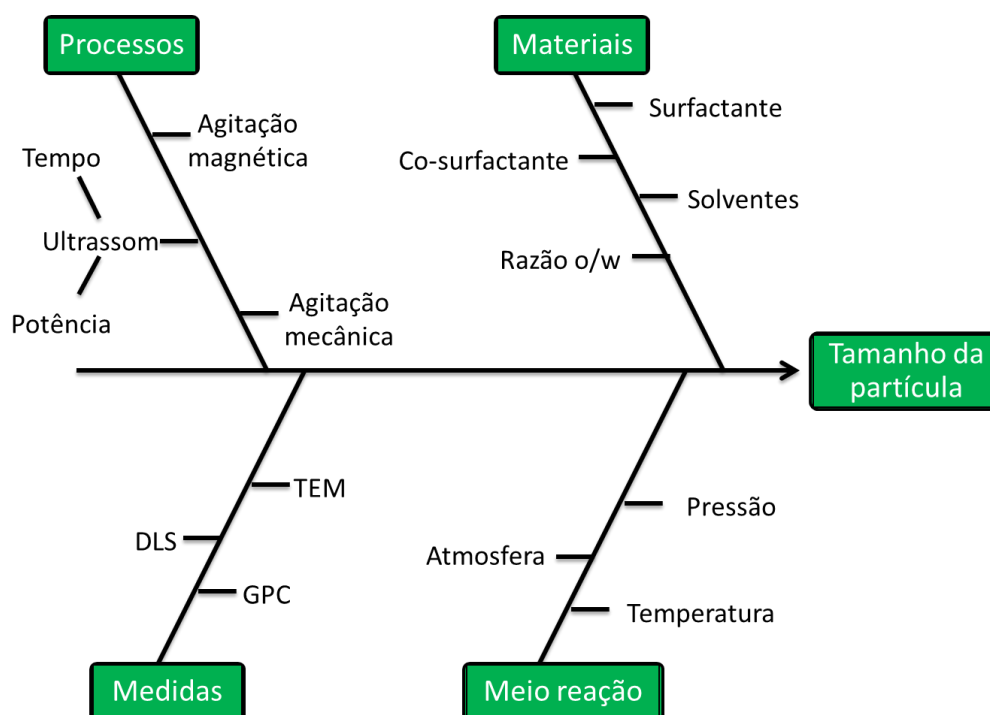


Figura 38. Fatores que afetam o tamanho de nanopartículas obtidas pelo método da emulsão/evaporação de solvente. Adaptado de (93).

Dessa forma, para superar as várias barreiras fisiológicas as pesquisas foram intensivas para desenvolver nanopartículas dos mais diversos tipos, tamanhos, morfologias, estabilidade coloidal e biocompatibilidade. Entre as diversas opções de polímeros, o policaprolactona (PCL), tem sido investigado em aplicações biomédicas devido a sua boa compatibilidade e baixa imunogenicidade, além de também ser aprovado pelo FDA. O PCL é um poliéster sintético de cadeia linear hidrofóbico, semicristalino, com ponto de fusão na faixa de 59 – 64°C. O produto de degradação do PCL é o ácido 6-hidroxihexanóico, que é um metabólito natural no corpo humano. A principal vantagem do PCL comparada a outros poliésteres alifáticos, tais como os ácidos polilático (PLA) e o poliglicólico (PGA), está na alta permeabilidade a fármacos, em especial os hidrofóbicos (94). Para aumentar a funcionalidade do PCL, a

síntese de copolímeros em bloco tem se mostrado promissora, capaz de alterar propriedades mecânicas, físicas e químicas através do ajuste da razão entre os blocos. Copolímeros em bloco composto de poli(etileno glicol) PEG e PCL tem atraído a atenção nas últimas décadas. Estes copolímeros apresentam estrutura do tipo caroço@casca, no qual o caroço hidrofóbico atua na incorporação de fármacos hidrofóbicos, enquanto a casca hidrofílica aumenta a solubilidade da nanopartícula. A funcionalização da superfície com PEG evita a agregação de nanopartículas e dificulta as interações não específicas com as células, formando uma interface estabilizada neutra, desde que a carga de superfície líquida das nanopartículas também seja neutra. Pode também proporcionar obstáculos e proteção estérica para plataformas que são sensíveis a um determinado ambiente. Por último, a PEGulação protege a nanopartícula contra degradação hidrolítica e enzimática (94–96).

1.4. Metotrexato

O metotrexato (Figura 39) é um antimetabólito frequentemente utilizado em quimioterapia para o tratamentos diversos tipos de doenças tais como a leucemia linfocítica, linfoma não-Hodgkin, osteossarcoma, coriocarcinoma e cânceres de mama, pescoço e cabeça (97). Sua atividade antineoplásica e imunossupressante deve-se a semelhança estrutural com o ácido fólico. O folato é uma das vitaminas do complexo B que atuam como cofatores em enzimas específicas permitindo que estas exerçam suas funções metabólicas, como na síntese de DNA e na divisão celular (98). A semelhança estrutural com o ácido fólico permite que o metotrexato (MTX) seja facilmente internalizado em células por receptores folatos e sua ação ocorre especificamente pela inibição da enzima dihidrofolato redutase. Esta enzima atua na formação de metabólitos intermediários tais como a síntese de purinas e ácidos timidílicos obtidos a partir da vitamina folato (99,100). Dessa forma, o MTX apresenta toxicidade para interromper a divisão celular em tumores.

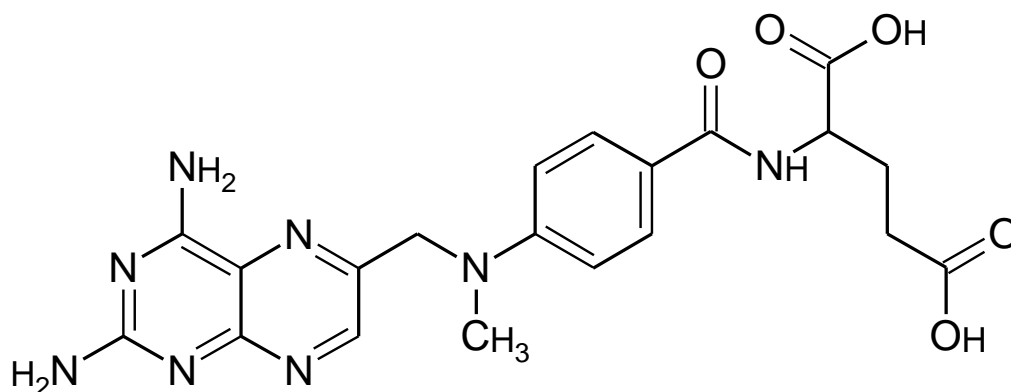


Figura 39. Representação da estrutura molecular do metotrexato.

2. Objetivos

Neste capítulo, o objetivo consiste na síntese e obtenção de nanopartículas de mPEG-co-PCL para estudo de incorporação e liberação de metotrexato como modelo de fármaco hidrofóbico. Os objetivos específicos incluem:

- A síntese copolímero mPEG-co-PCL pelo método de abertura de anel da caprolactona;
- Obtenção de nanopartículas de mPEG-co-PCL pelo método emulsão/evaporação por solvente, empregando planejamento fatorial para controle do tamanho de nanopartículas;
- Estudo de incorporação e liberação de metotrexato nas nanopartículas de mPEG-coPCL.

3. Experimental

3.1. Reagentes utilizados:

Todos os reagentes utilizados na síntese e caracterização das amostras apresentam pureza analítica e compõe a Tabela 10. Para as sínteses que necessitaram de uma atmosfera livre de oxigênio e inerte foi utilizado argônio (Ar) comercial. Os reagentes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio para promover a purificação dos mesmos.

Tabela 10. Reagentes utilizados no capítulo 2.

Reagentes	Fórmula Molecular	Marca
2-etilhexanoato de estanho (II)	$C_{16}H_{30}O_4Sn$	Sigma
Acetona	C_3H_6O	Synth
Dodecano	$C_{12}H_{26}$	Sigma
Metotrexato (MTX)	$C_{20}H_{22}N_8O_5$	Sigma
Poli(etilenoglicol) metil éter (550g mol ⁻¹) mPEG	$CH_3(OCH_2CH_2)_nOH$	Sigma
Tetraidrofurano	C_4H_8O	JTBaker
Tween80®	$C_{24}H_{44}O_6$	Sigma
ϵ – Caprolactona	$C_6H_{10}O_2$	Sigma

3.2. Síntese copolímero mPEG-co-PCL

O copolímero mPEG-co-PCL foi obtido a partir da abertura de anel do monômero de ϵ -caprolactona, utilizando 2-etilhexanoato de estanho (II) como catalisador da reação (101). Em um balão de duas bocas foram adicionados $1,05 \times 10^{-3}$ mol de catalisador, m-PEG e ϵ – caprolactona nas proporções, em mol, de 1,0:1,0; 1,0:10,0 e 1,0:30,0. O sistema foi mantido sob agitação magnética e em atmosfera de argônio durante o período de três horas à 120,0 °C. Após o término da reação, o copolímero foi dissolvido em clorofórmio e precipitado em hexano gelado três vezes para remoção de catalisadores e monômeros.

3.3. Obtenção de nanopartículas de m-PEG-co-PCL: Planejamento fatorial

Nanopartículas do copolímero m-PEG-co-PCL foram obtidas pelo método de emulsão/evaporação de solvente. Uma massa de 0,050 g do copolímero e determinado volume de dodecano (cosurfactante) foram dissolvidos em acetona, constituindo a fase orgânica da emulsão. A fase aquosa foi composta por 20,0 mL de solução de Tween80®. A fase aquosa e orgânica foi submetida à agitação magnética e, durante a agitação, o sistema foi disperso em ponteira ultrassônica, utilizando uma amplitude de 30% e pulso

de 03 segundos ligado e 03 segundos desligado, durante 20 minutos (102). Para estudar o efeito da concentração de surfactante, de cosurfactante e da razão óleo/água (o/w) no tamanho das nanopartículas obtidas pela emulsão foi utilizado planejamento fatorial. A Tabela 11 apresenta as condições experimentais para obtenção das nanopartículas m-PEG-co-PCL.

3.4. Estudo de incorporação e liberação de metotrexato

O estudo de incorporação de metotrexato nas nanopartículas de mPEG-co-PCL foi realizado em tampão fosfato, em pH 7,4, empregando diferentes concentrações do fármaco. Uma massa de 10 mg do copolímero foi dispersa em 0,60 mL de acetona contendo 0,20, 0,60 e 1,00 mg de metotrexato. A incorporação do metotrexato foi realizada pelo método da emulsão por evaporação do solvente nas condições que resultaram em menor tamanho de nanopartículas obtida pelo planejamento experimental apresentado no item anterior. Foi adicionado 10,0 μL de dodecano à fase orgânica contendo o copolímero e o fármaco. A fase orgânica foi dispersa em 12,0 mL de solução aquosa de Tween80 ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). A fase aquosa e orgânica foi submetida à agitação magnética e, durante a agitação, o sistema foi disperso em ponteira ultrassônica, utilizando uma amplitude de 30% e pulso de 03 segundos ligado e 03 segundos desligado, durante 20 minutos. Após esse período, as nanopartículas foram removidas por centrifugação (10000 rpm durante 30 minutos) e o sobrenadante foi utilizado na análise espectrofotométrica para determinação de metotrexato não incorporado. A concentração de metotrexato foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis considerando a lei de Lambert Beer ($A=ab[x]$), na qual a absorção A é proporcional a concentração $[x]$, sendo “ a ” absortividade molar e “ b ” o caminho ótico da cubeta. A absorção máxima de metotrexato ocorre no comprimento de onda de 303 nm, valor fixado para determinação das concentrações do fármaco. A curva analítica foi obtida a partir de uma solução de MTX na faixa de concentração de 0 a 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, cuja reta obtida apresentou coeficiente de correlação de 0,997 e absortividade de 0,0304 $\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$.

A eficiência de incorporação e o teor de metotrexato foram obtidas, respectivamente, pelas Equação 9 e Equação 10, no qual m_f e m_i

correspondem à massa de fármaco livre e massa de fármaco inicial, respectivamente (103).

$$\text{Eficiência de Incorporação (\%)} = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Teor de fármaco (\%)} = \left(\frac{m_{\text{fármaco incorporado}}}{m_{\text{fármaco incorporado}} + m_{\text{polímero}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Tabela 11. Fatores e níveis utilizados para o planejamento fatorial

Fator	Nível inferior		Nível Superior	
	Valor	Código	Valor	Código
A Tween80®	1x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	(-)	1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	(+)
B Dodecano	50 uL	(-)	500 uL	(+)
C o/w	5%	(-)	10%	(+)

O estudo de liberação do metotrexato foi realizado a partir da dispersão das amostras de copolímeros contendo metotrexato que apresentaram melhor resultado de incorporação. O material foi disperso em 0,5 mL de tampão fosfato e transferido quantitativamente para uma membrana de diálise (6 cutoff). A liberação foi determinada por espectroscopia UV-Vis, em função do tempo, a 37 °C. Em intervalo de tempo regular, foram removidas alíquotas de 0,75 mL do meio de liberação e substituídas pelo mesmo volume de tampão fosfato. A porcentagem de liberação cumulativa de metotrexato foi calculada de acordo com a Equação 11, no qual m_{MTX} corresponde a massa de metotrexato presente na nanopartícula, V_0 é o volume total do meio de liberação ($V_0=15,0$ mL), V_t é o volume de alíquotas removida no tempo t ($V_t=0,75$ mL) e C_n é a concentração de metotrexato na amostra (56).

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{\text{MTX}}} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

4. Resultados e discussão:

4.1. Síntese e caracterização do copolímero m-PEG-co-PCL

A copolimerização do m-PEG-co-PCL ocorre pelo mecanismo de abertura de anel do monômero de ϵ -caprolactona. O m-PEG atua como macroiniciador da reação de polimerização, cuja hidroxila terminal da cadeia do m-PEG realiza o ataque nucleofílico na carbonila do monômero de ϵ -caprolactona, conforme o esquema apresentado na Figura 40. O 2-etilhexanoato de estanho (II) é o catalisador mais frequentemente utilizado na polimerização da caprolactona por abertura de anel. A propagação da polimerização proposta consiste na coordenação do monômero com o catalisador, seguido da inserção do monômero pela ligação metal – oxigênio do catalisador (104). Nesta etapa foram obtidos copolímeros com variação no comprimento da cadeia polimérica, aumentando o segmento hidrofóbico do PCL em função do aumento da razão molar do monômero. Em estudos preliminares desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, a temperatura e o tempo de síntese não resultou em variação significativa na massa molecular do polímero, sendo a quantidade de monômero de caprolactona o principal responsável pelo crescimento da cadeia polimérica. A principal vantagem no procedimento adotado é a ausência de solvente orgânico durante a síntese, que segundo a literatura provoca diminuição no rendimento da polimerização. Também foi possível reduzir o tempo de síntese para três horas e obter massas moleculares próximas as obtidas por Meerod et al. (105).

A estrutura molecular do copolímero foi determinada por espectroscopia na região do infravermelho para as amostras de mPEG-co-PCL. Na Figura 41 são observados os estiramentos assimétricos e simétricos de C – H em 2955 cm^{-1} e 2858 cm^{-1} , respectivamente. O grupo metil da extremidade da cadeia de PEG corresponde a uma flexão de C – H em 1375 cm^{-1} . O principal estiramento do grupo éter (C – O – C) é observado em 1172 cm^{-1} . A presença de PCL é confirmada devido ao estiramento da carbonila (C = O) de éster em 1720 cm^{-1} (106).

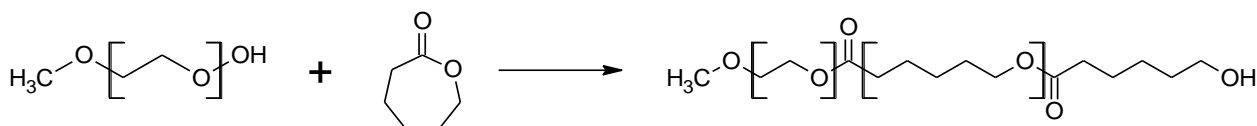


Figura 40. Esquema de síntese do copolímero m-PEG-co-PCL.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons das amostras corrobora na caracterização dos materiais sintetizados. Os prótons referentes aos grupos metóxi e metilenos da cadeia do m-PEG correspondem ao deslocamento em 3,37 ppm e 3,67 ppm, respectivamente. O pico em 2,29 ppm é referente aos hidrogênios de metileno mais próximos à carbonila na cadeia de PCL, confirmando a copolimerização da reação (106). Os picos em 4,04 ppm, 1,63 ppm e 1,38 ppm são referentes aos hidrogênios da cadeia de PCL, conforme pode ser observado nos espectros da Figura 42. É possível observar que conforme aumenta-se o número de mol de ϵ -caprolactona utilizado na síntese o sinal do mPEG em 3,67 ppm diminui em relação aos demais sinais da policaprolactona, sugerindo aumento no seguimento de hidrofóbico.

Os resultados da análise da cromatografia por permeação em gel estão resumidos na Tabela 12 e apresentados na Figura 43. O perfil cromatográfico apresenta diferentes tempos de retenção para cada copolímero obtido, cuja massa molecular variou de 2600 g mol^{-1} para 8450 g mol^{-1} . A mesma tendência observada na estimativa de massa molecular por ressonância magnética nuclear pode ser confirmada através dos resultados de cromatografia por permeação em gel. Também é possível observar a ampla área de pico das amostras indicando que a polimerização em massa resulta em sistemas de baixo controle na distribuição de massa molecular, com valor de dispersão M_w/M_n superior a 1,2, indicando que todos os copolímeros obtidos são polidispersos.

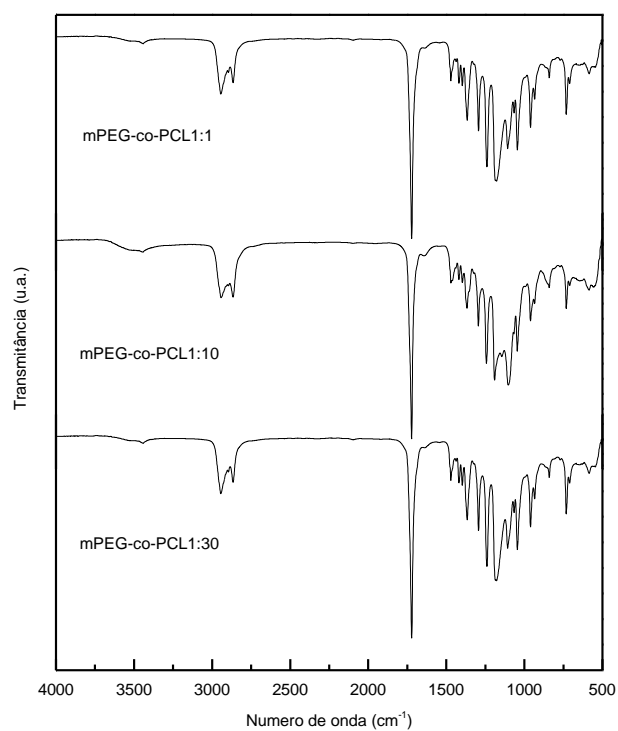


Figura 41. Espectros na região do infravermelho dos copolímeros mPEG-co-PCL.

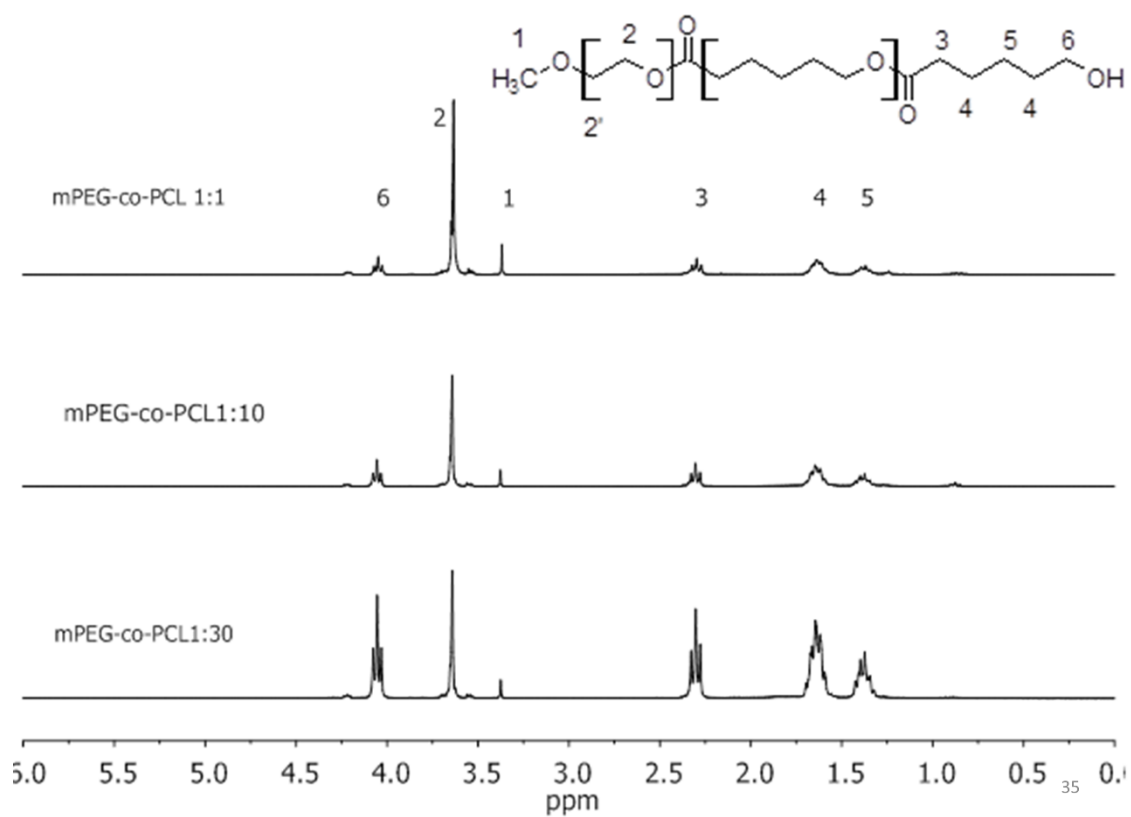


Figura 42. Espectros de ^1H RMN das amostras de copolímero mPEG-co-PCL.

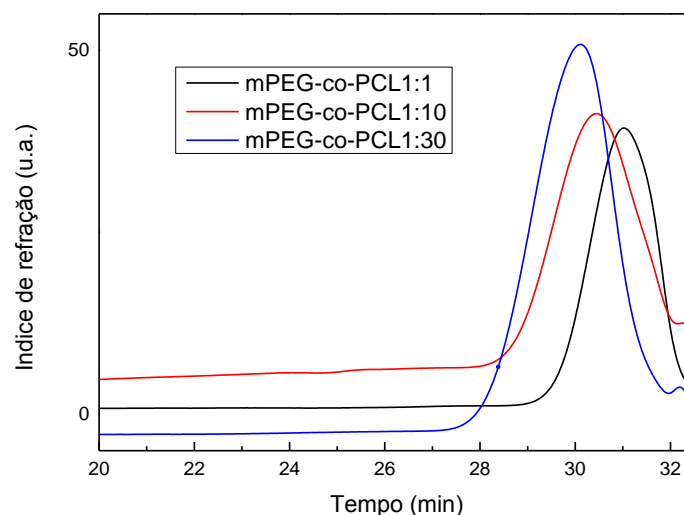


Figura 43. Perfil cromatográfico das amostras de copolímero

Tabela 12. Massas molares das amostras de copolímero e polidispersão.

Amostra	M_n (g mol ⁻¹)	M_w (g mol ⁻¹)	M_w/M_n
mPEG-co-PCL 1:1	2,60	3,35	1,29
mPEG-co-PCL 1:10	3,98	6,44	1,62
mPEG-co-PCL 1:30	8,45	10,96	1,46

4.2. Obtenção de nanopartículas de m-PEG-co-PCL

A obtenção de nanopartículas pelo método da emulsão por evaporação de solvente pode ser compreendida por uma sequência de fenômenos. Na primeira etapa, uma emulsão é obtida, formando gotas contendo o copolímero dissolvido na fase dispersa. À medida que o solvente orgânico é evaporado a concentração de copolímero aumenta dentro da gota até um ponto crítico, no qual a concentração do polímero supera sua solubilidade na fase aquosa, ocorrendo à precipitação de nanopartículas na etapa final.

O método da emulsão por evaporação de solvente permite controlar o tamanho e estabilização das nanopartículas ajustando as condições durante a etapa de emulsão de forma a evitar a coalescência e/ou degradação difusional destas nanopartículas. A coalescência ocorre quando há ruptura da camada superficial de duas partículas, devido aos choques causados pelo movimento Browniano. A coalescência pode ser evitada pela adição de surfactante, pois

além de aumentar a camada superficial promove a estabilização estérica das nanopartículas poliméricas. A degradação difusional consiste na transferência de massa de partículas menores para partículas maiores. Isto ocorre devido à pressão osmótica dentro das gotas pequenas ser muito maior que em gotas maiores, favorecendo a difusão de forma a aumentar a estabilidade termodinâmica (29). A degradação difusional é suprimida pela adição de um cosurfactante que seja insolúvel na fase dispersa, aumentando assim a pressão osmótica dentro da gota da emulsão (30).

Para avaliar os fatores que afetam o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas poliméricas foi utilizado o planejamento fatorial com três variáveis: concentração de surfactante (A), concentração de cosurfactante (B) e razão óleo/água (C). A principal vantagem em utilizar o planejamento experimental está no número reduzido de experimentos necessários, diminuindo o tempo de sínteses e o consumo de reagentes. Neste caso, para cada fator estudado foi avaliado a resposta de diâmetro em dois níveis diferentes, sendo realizado um total de 16 experimentos (duplicata) cujo resultado médio pode ser observado na Tabela 13. O planejamento fatorial também permite elucidar quais variáveis são mais relevantes e se ocorre interação entre estas variáveis. A Figura 44 apresenta os efeitos de cada variável. Os efeitos ou interações que apresentam maior influência no tamanho das nanopartículas são os que possuem valores acima ou abaixo da variação do erro (36,9), representado pela linha tracejada no gráfico. Comparando os valores da tabela 6 com o gráfico da Figura 44, é possível observar que as interações entre os efeitos são irrelevantes e não resultam em grande variação no diâmetro hidrodinâmico. A variação da concentração de surfactante indica que ocorre uma diminuição de 113,2% no diâmetro hidrodinâmico quando a concentração passa do seu valor mínimo para o máximo. A diminuição do tamanho das nanopartículas é esperada com o aumento da concentração de surfactante, pois há mais surfactante disponível para recobrir e estabilizar a superfície das nanopartículas (107,108). Para o aumento da concentração de cosurfactante é observado comportamento oposto, ocorrendo aumento de 74,6% no diâmetro hidrodinâmico. A influência positiva do cosurfactante no tamanho da nanopartícula deve-se a encapsulação do cosurfactante no interior

da nanopartícula, ou seja, quanto mais cosurfactante é utilizado na síntese maior o tamanho das nanopartículas obtidas (93). Embora a variável razão óleo/água seja superior ao erro dos efeitos, o teste de probabilidade realizado com 5% de significância exclui a relevância desta variável no diâmetro hidrodinâmico. Dessa forma, a concentração de surfactante e cosurfactante são os efeitos que devem ser considerados para se obter nanopartículas de copolímeros com diferentes tamanhos. A interação destes efeitos não resulta em variação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e pode ser compreendido como um efeito nulo em função das direções opostas que cada variável provoca no tamanho do material.

Tabela 13. Matriz de planejamento fatorial para triagem das variáveis mais relevantes para o controle do diâmetro hidrodinâmico. (A) concentração de Tween80®, (B) volume de dodecano e (C) razão óleo/água.

Experimento	A	B	C	Dh (nm)
1	(-)	(-)	(-)	227,73
2	(+)	(-)	(-)	79,50
3	(-)	(+)	(-)	285,80
4	(+)	(+)	(-)	146,17
5	(-)	(-)	(+)	233,37
6	(+)	(-)	(+)	167,50
7	(-)	(+)	(+)	336,70
8	(+)	(+)	(+)	237,67

Após simplificação dos fatores que não são significativos, a superfície de resposta do diâmetro hidrodinâmico em função da variação da concentração de surfactante e cosurfactante pode ser observada na Figura 45. Nanopartículas com menor diâmetro hidrodinâmico são obtidas utilizando maior concentração de Tween80® e menor concentração de dodecano, cujo modelo matemático de regressão linear que representa este comportamento está descrito na Equação 12.

$$D_h = -1,2 \times 10^6 A + 0,166 B + 237,9 \quad \text{Equação 12.}$$

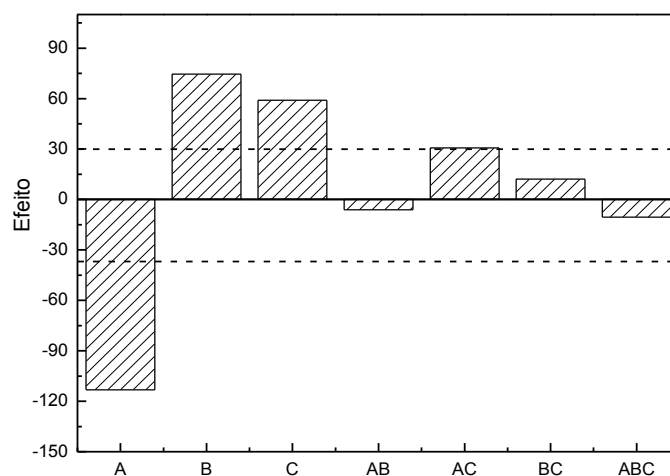


Figura 44. Efeito dos fatores e interações tendo como resposta o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

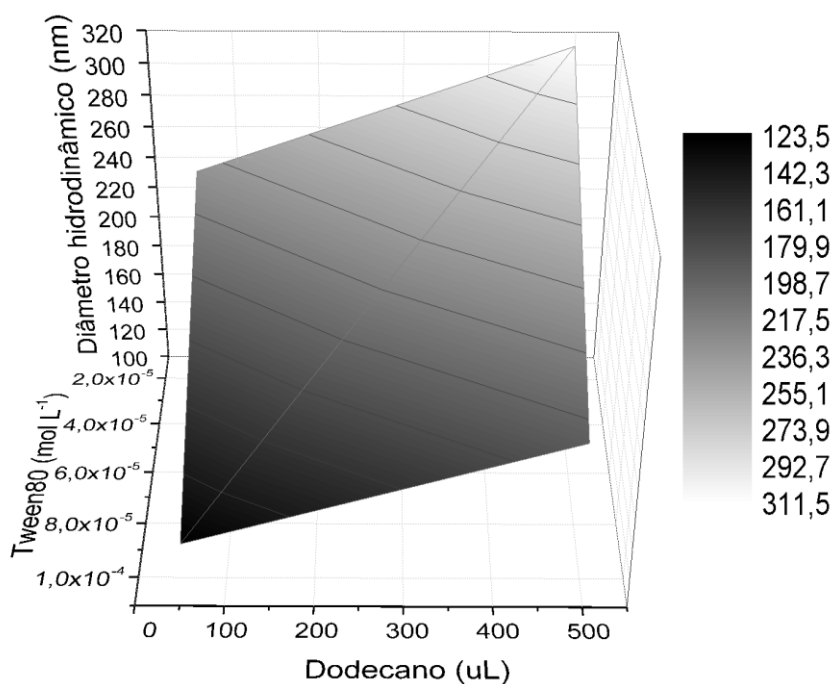


Figura 45. Modelo tridimensional para predição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de copolímero mPEG-co-PCL.

O planejamento fatorial descrito acima foi realizado utilizando a amostra mPEG-co-PCL 1:10. As demais amostras foram submetidas ao mesmo

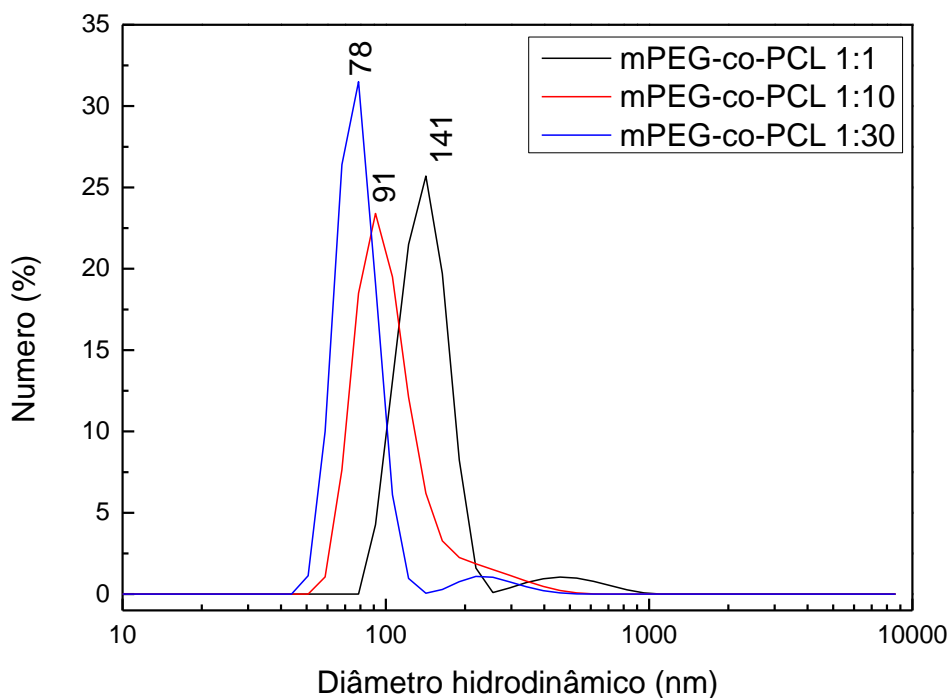


Figura 46. Perfil de distribuição do diâmetro hidrodinâmico das amostras: (A) mPEG-co-PCL 1:1, (B) mPEG-co-PCL 1:10 e (C) mPEG-co-PCL 1:30.

procedimento, utilizando as condições para obtenção de partículas com menor diâmetro hidrodinâmico. Devido aos diferentes tamanhos de cadeia, o valor do diâmetro obtido sofreu um desvio do valor previsto na regressão linear. Com o aumento do segmento hidrofóbico no copolímero o diâmetro hidrodinâmico aumentou de 78,82 nm para 141,8 nm, conforme pode ser observado na Figura 46. Observa-se a formação de uma pequena população de agregados de aproximadamente 400 nm, justificando o levado valor de polidispersão obtido para as amostras, que variou de 0,240 a 0,344.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 47) mostram a formação de nanopartículas com morfologia esférica, com tamanho inferior ao obtido pela técnica de espalhamento de luz. Com o aumento do segmento hidrofóbico foi possível observar mais nitidamente a formação de nanopartículas. A dificuldade em se obter imagem das amostras de menor massa molecular deve-se ao processo de secagem do material, no qual as nanoestruturas são destruídas na ausência de água.

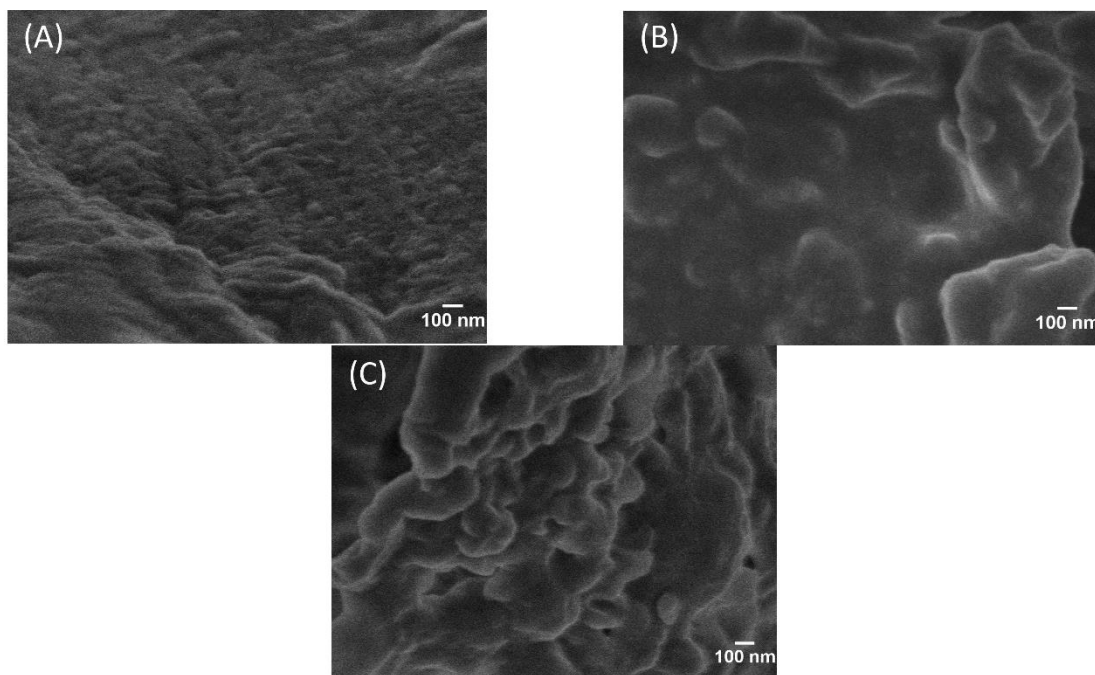


Figura 47. Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras: (A) mPEG-co-PCL 1:1, (B) mPEG-co-PCL 1:10 e (C) mPEG-co-PCL 1:30.

A superfície das nanopartículas de copolímeros foi caracterizada por medidas de potencial Zeta em função do pH, de acordo com a Figura 48. O ponto isoelétrico, observado em pH 4,17, foi coincidente para todas as amostras. Os copolímeros não atingiram valor de potencial zeta abaixo de -30,0 mV na faixa de pH estudada. Os coloides que apresentam valor de potencial zeta acima de $\pm 30,0$ mV são considerados estáveis devido a repulsão eletrostática (109). Em pH 7,4, as nanopartículas de copolímero apresentaram valores de potencial zeta mais negativo com o aumento do segmento hidrofóbico de PCL. Este comportamento deve-se aos grupos carbonilas da cadeia de PCL que, embora não apresentem íons, induz densidade de carga negativa baixando o valor de potencial zeta.

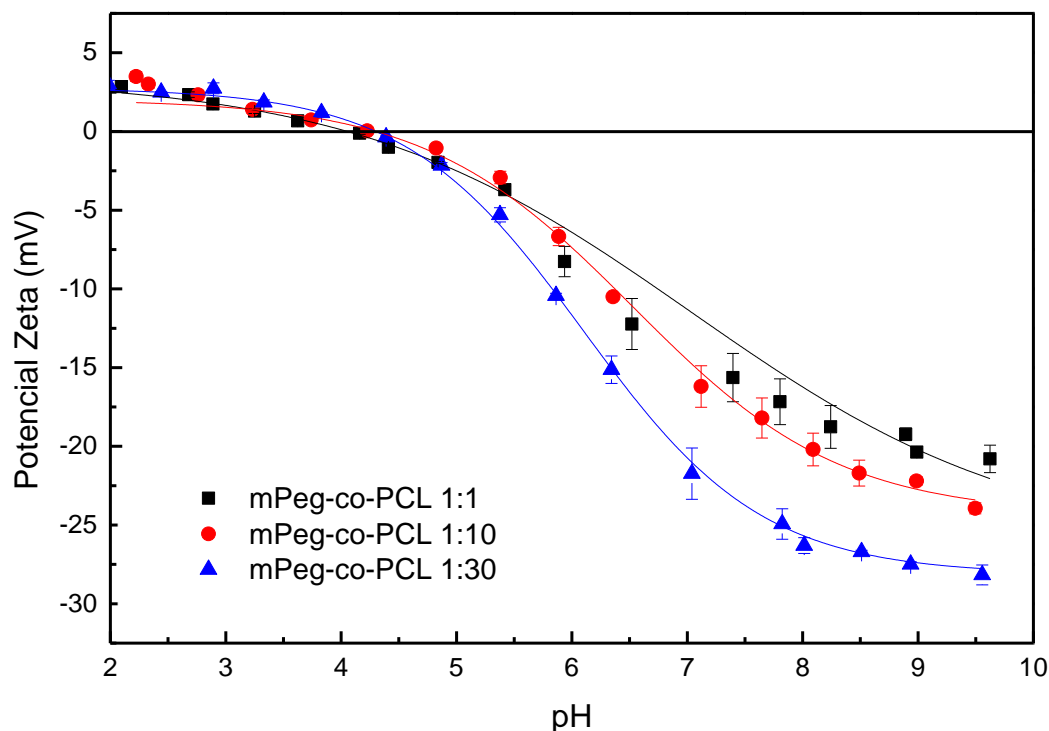


Figura 48. Potencial Zeta versus pH para as amostras de nanopartículas de copolímero.

4.3. Incorporação e liberação de metotrexato

A espectroscopia UV-Vis foi utilizada para quantificar a concentração de metotrexato no estudo de incorporação e liberação do fármaco nas nanopartículas de mPEG-co-PCL. O espectro de absorção obtido (Figura 49A) apresenta três bandas características em 258, 303 e 371 nm, sendo a de comprimento de onda intermediária a de maior intensidade. A Figura 49B apresenta a curva analítica obtida a partir de concentrações conhecidas de metotrexato, resultando em uma reta cujo o valor de absorvidade molar obtido foi de $0,0304 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear de 0,9972.

O metotrexato é um fármaco que apresenta baixa solubilidade em água. Devido a esta característica físico química, a incorporação do fármaco é atribuída as interações com o segmento hidrofóbico de PCL do copolímero. Para cada composição do copolímero foi avaliado a eficiência de incorporação do fármaco partindo de três quantidades distintas de metotrexato. A Tabela 14 resume os valores obtidos para eficiência de incorporação e teor de metotrexato para cada amostra. É observado que a eficiência de incorporação

do fármaco não aumenta ao adicionar mais metotrexato na dispersão, atingindo um patamar próximo a 84,00% utilizando 0,6 mg de fármaco. Entretanto, o teor de metotrexato incorporado aumenta com a adição de mais fármaco, atingindo o valor máximo de 7,81%, conforme pode ser melhor observado na Figura 50. Para o estudo de liberação, foi considerado o bloco de amostras com maior teor de metotrexato incorporado.

Tabela 14. Caracterização da incorporação de metotrexato nas nanopartículas de mPEG-co-PCL

Amostra	Massa copolímero (mg)	Massa MTX inicial (mg)	Massa MTX incorporada (mg)	Eficiência de Incorporação (%)	Teor de MTX (%)
1:1	10	0,20	0,18	92,61	1,82
1:10	10	0,20	0,18	93,13	1,83
1:30	10	0,20	0,18	93,78	1,84
1:1	10	0,60	0,49	82,13	4,70
1:10	10	0,60	0,50	83,53	4,77
1:30	10	0,60	0,51	84,61	4,83
1:1	10	1,00	0,84	84,11	7,76
1:10	10	1,00	0,842	84,24	7,77
1:30	10	1,00	0,85	84,74	7,81

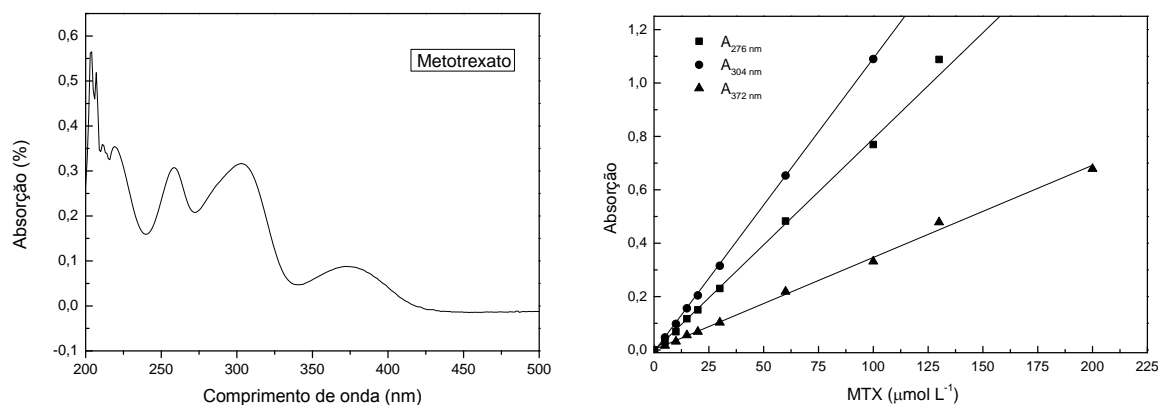


Figura 49. (A) Espectro de absorção de metotrexato. (B) Curva analítica para metotrexato nos comprimentos de onda 276, 304 e 372 nm.

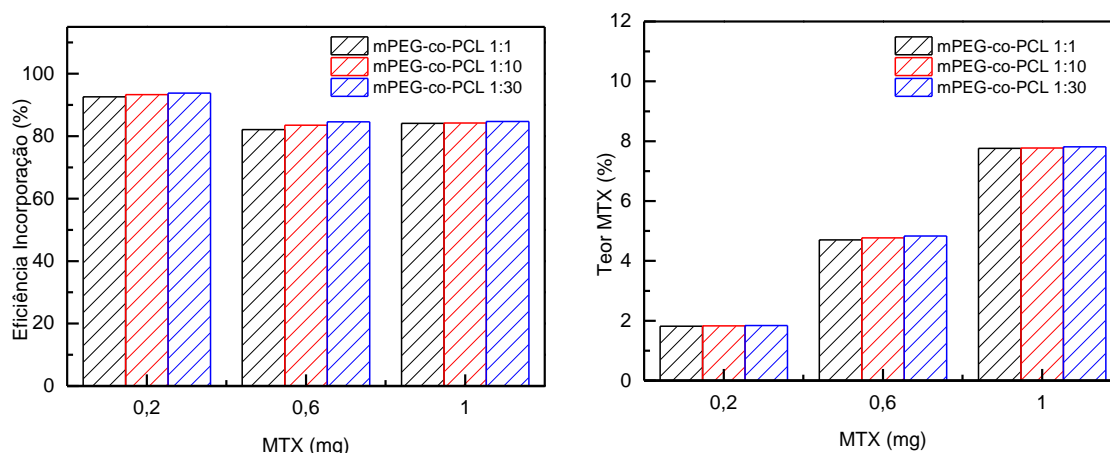


Figura 50. Eficiência e teor de incorporação de metotrexato.

A Figura 51 apresenta o perfil de liberação das amostras de copolímero, bem como dos polímeros precursores individuais. Nesta figura a amostra cuja plataforma utilizada foi de mPEG pode-se observar uma liberação rápida, atingindo 90,85% de liberação durante 12 horas de análise. Para a amostra contendo apenas PCL, durante as primeiras 8 horas de análise é observado aumento da liberação de metotrexato (19,65%), seguido de uma intensa diminuição da taxa de liberação do fármaco. Para as amostras de copolímero foi observado comportamento similar ao descrito acima. A amostra mPEG-co-PCL 1:1, que apresenta a menor segmento de PCL, resultou na liberação de 42,91% de metotrexato em 16 horas, enquanto que as amostras mPEG-co-PCL 1:10 e mPEG-co-PCL 1:30 liberaram, respectivamente, 15,58% e 13,45% no mesmo período. Após 16 horas, é observado um patamar de liberação até o

término das 96 horas de análise. Dessa forma, o aumento do segmento hidrofóbico do copolímero resulta na diminuição da liberação do metotrexato. A literatura relata que a adição de componentes hidrofílicos à cadeia de PCL permite ajustar a taxa de liberação de fármaco nos sistemas de blendas poliméricas (110). Entretanto o mecanismo de liberação não está totalmente esclarecido para o caso de nanopartículas poliméricas. Pelo perfil de liberação apresentado na Figura 51, observa-se que o comportamento após 24 horas de liberação é bem diferente das horas iniciais de análise. A interpretação deste comportamento pode estar relacionada com as diferentes interações do metotrexato com os segmentos do copolímero. Por se tratar de um fármaco hidrofóbico, a interação do metotrexato com o segmento hidrofóbico do copolímero (PCL) é forte, o que resulta em uma liberação lenta. Dessa forma, é esperado que a liberação do metotrexato ocorra a medida que o polímero seja degradado pelo organismo (111,112). Em relação as primeiras horas do experimento, o metotrexato liberado pode ser proveniente de interações fracas com mPEG (burst effect).

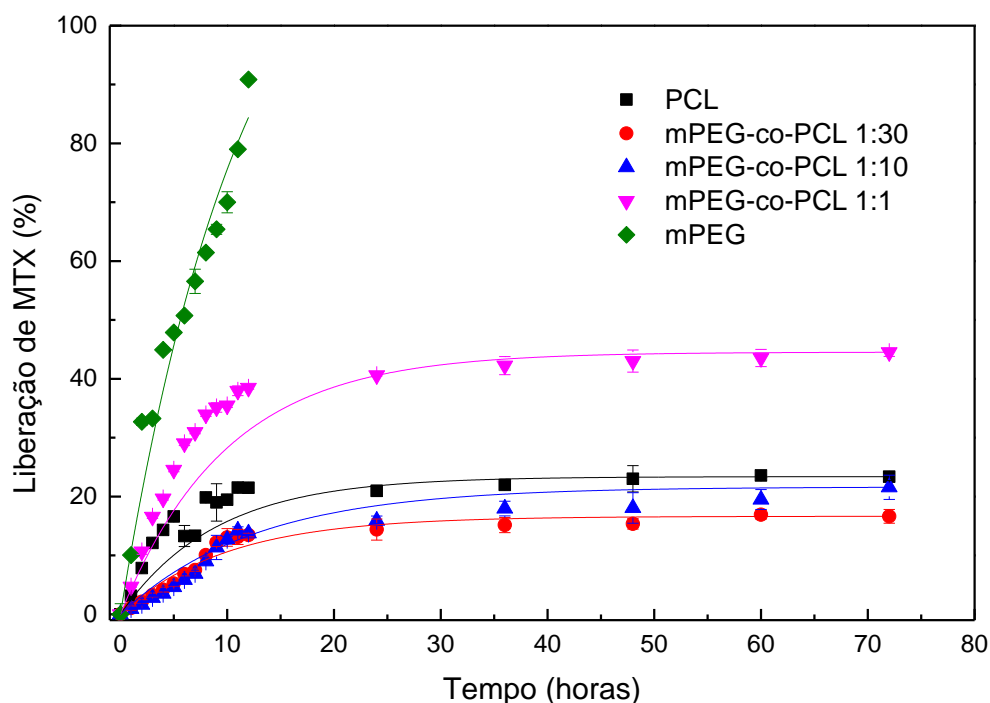


Figura 51. Perfil de liberação de metotrexato das amostras mPEG-co-PCL 1:1, mPEG-co-PCL 1:10, mPEG-co-PCL 1:30, mPEG e PCL.

O modelo de Peppas (10,113) foi utilizado para elucidar o mecanismo na etapa inicial de liberação de metotrexato, permitindo a determinação do expoente de liberação (n) e a constante cinética (k), a partir da linearização do modelo, conforme descrito no capítulo anterior pela Equação 8. O gráfico da fração de liberação em função do tempo pode ser observado na Figura 52 e os parâmetros determinados nesta curva compõe a Tabela 15.

A linearização foi realizada para as primeiras 10 horas de monitoramento, região compreendida entre os 60% de liberação inicial, no qual o modelo de Peppas é válido e os valores de coeficiente de correlação apresentam valores superiores a 0,99. Os valores do expoente de liberação obtido pela linearização das curvas estão compreendidos entre 0,44 e 0,63 para as amostras de nanopartículas, que, para plataformas de liberação esféricas, deve ser interpretado como transporte anômalo, segundo Peppas et al (114). Este resultado corrobora com o perfil de liberação, pois especula-se que a liberação lenta do metotrexato está relacionado com as interações com o seguimento hidrofóbico da nanopartícula, sendo necessário relaxação e/ou degradação das cadeias da nanopartícula para liberação do metotrexato.

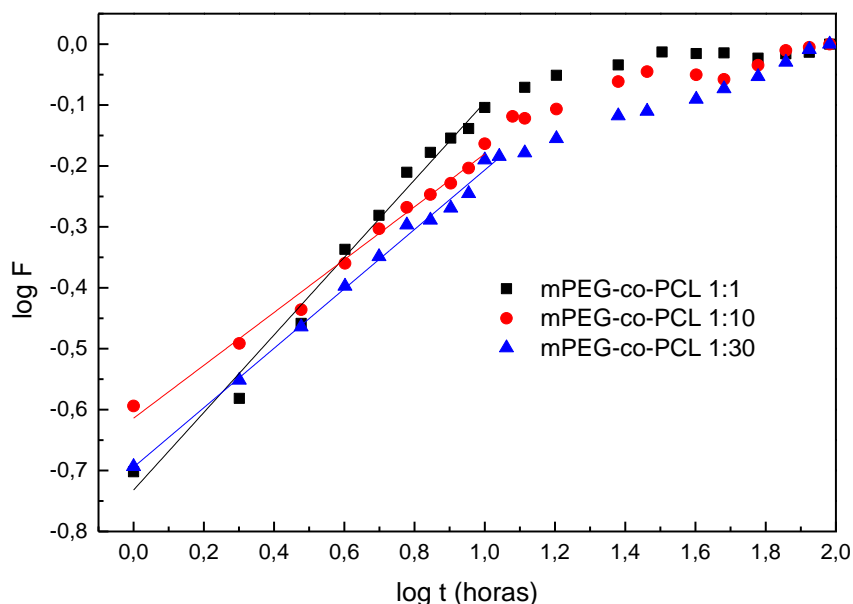


Figura 52. Curva bi-logarítmica da fração de metotrexato liberado em função do tempo.

Tabela 15. Parâmetros obtidos da curva cinética de liberação de metotrexato das nanopartículas de copolímero.

Amostra	n	k (h ⁻¹)	R ²
mPEG-co-PCL 1:1	0,63	0,185	0,993
mPEG-co-PCL 1:10	0,44	0,243	0,994
mPEG-co-PCL 1:30	0,48	0,202	0,997

5. Conclusões parciais

Foi possível obter copolímero de mPEG-co-PCL com diferentes tamanhos de cadeia polimérica através da reação de polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -caprolactona. O estudo de planejamento fatorial permitiu determinar que o aumento da concentração de surfactante e a diminuição da concentração de cosurfactante são as condições ideais para obtenção de nanopartículas poliméricas de menor diâmetro hidrodinâmico, uma vez que a metodologia da emulsão/evaporação por solventes para síntese de nanopartículas apresenta diversas variáveis que influenciam no tamanho do material. A estas nanopartículas foi realizado estudo de incorporação de metotrexato, fármaco hidrofóbico utilizado como modelo neste trabalho, que resultou em eficiência de incorporação de metotrexato superior a 80,0%. A liberação de metotrexato ocorre por mecanismos distintos em função da diferença de interação do fármaco com o seguimento hidrofílico e hidrofóbico do copolímero de mPEG-co-PCL. Na etapa inicial foi observado que o mecanismo de liberação corresponde a um transporte anômalo, que não obedece a lei de difusão de Fick, devido a fraca interação do metotrexato com o segmento hidrofílico e processos de relaxação do segmento hidrofóbico do copolímero na etapa inicial. A liberação completa do metotrexato é dependente da lenta biodegradação da cadeia de PCL.

Capítulo 3

Plataformas de liberação simultânea de fármacos

1. Introdução

1.1. Sistemas de liberação controlada simultânea de fármacos

Nas últimas décadas os sistemas de liberação controlada de fármacos foram vastamente estudados com intuito de melhorar a estabilidade coloidal destas plataformas, problemas relacionados a solubilidade dos fármacos e o tempo de circulação no organismo, entre outros problemas relatados pela literatura. Estes problemas foram superados com o desenvolvimento das mais variadas estruturas que podem ser utilizadas como dispositivos de liberação controlada de fármacos, tais como nanopartículas poliméricas (115–117), dendrímeros (118,119), micelas (78,120,121), hidrogéis (21,70,122–124).

Recentemente, a combinação de terapias utilizando fármacos com diferente ação terapêutica tem se tornando uma alternativa efetiva para o tratamento de doenças e regeneração de tecidos. Tem-se usado estas estratégias principalmente no tratamento de câncer, no qual diferentes fármacos podem atacar células malignas em diferentes estágio de seu ciclo de crescimento (125). O desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada permite a combinação de terapias, na qual fármacos com propriedades físico-químicas distintas, tal como a solubilidade, podem estar presentes em um mesmo sistema de liberação, aumentando a eficácia do tratamento.

Os principais desafios no estudo de sistemas duplo de liberação consistem em desenvolver uma plataforma eficiente capaz de controlar o comportamento de liberação de cada fármaco independentemente e minimizar os efeitos colaterais do tratamento (125–128). A concentração do sistema de liberação em um sítio específico no corpo diminui a necessidade de grandes doses para garantir alta concentração local, reduzindo a toxicidade e o desconforto causado por efeitos colaterais.

Numata et al (126) desenvolveram um sistema duplo de liberação controlada a partir de hidrogel de seda contendo nanopartículas de seda utilizando corantes como molécula modelo de liberação. Segundo os autores, a liberação é modulada ao controlar parâmetros com o tamanho das nanopartículas. Wei et al (127) também desenvolveram um sistema duplo de liberação a base de hidrogel e micelas para a liberação de aspirina e doxorrubicina. Neste trabalho as micelas foram formadas a partir de um copolímero tribloco que apresentava sensibilidade ao pH e temperatura, de forma que a liberação da doxorrubicina fosse controlada ajustando estes parâmetros. Yan et al (129) propõe o desenvolvimento de um novos scaffolds para engenharia de tecidos ou sistema de liberação de fármacos capaz de encapsular albumina de soro bovino e rodamina B a partir de nanofibras de poli(l-lático-co-caprolactona) obtidos por eletrospiação. Estes exemplos ilustram alguns dos trabalhos desenvolvidos na última década em relação aos avanços científicos frente aos sistemas duplos de liberação.

1.2. Interações entre fármacos: diclofenaco versus metotrexato

A interação entre fármacos corresponde a administração conjunta de dois ou mais medicamento e podem ser classificadas por diferentes mecanismos. As interações entre fármacos ocorrem a partir de: i) interações farmacocinéticas, como, por exemplo, alterações na absorção do fármaco, distribuição de volume, metabolismo ou excreção; ii) interações farmacodinâmicas, tais como efeito aditivo, sinérgico ou antagônico capaz de alterar a concentração plasmática do fármaco no sangue; iii) incompatibilidade farmacêutica, ou ainda a combinação de todos estes efeitos. Um tipo comum de interação entre fármacos e os NSAID, classe de fármacos no qual o diclofenaco está incluso, ocorre quando há competição entre proteínas que se ligam aos fármacos no plasma sanguíneo para eliminação destas moléculas (130).

Este é o tipo de interação que ocorre entre o diclofenaco e o metotrexato. O metotrexato é administrado em alta doses para o tratamento quimioterápico ou em doses menores para o tratamento de psoríases ou artrite reumatoide. Entretanto, foi descoberto que o diclofenaco, quando administrado

em conjunto, reduz a eliminação renal do metotrexato aumentando a toxicidade deste, principalmente durante a quimioterapia (130).

O diclofenaco teve seu primeiro uso nas práticas oncológicas no tratamento de dores. As primeiras evidências do uso de diclofenaco no tratamento de tumores surgiu com a redução da taxa de crescimento e dos níveis de vascularização em tumores (fibrosarcoma) induzidos em ratos (131). Embora exista uma grande variedade de resultados, há uma escassez de dados relativos ao uso do diclofenaco como anticâncer quando comparado a seu uso como analgésico (132). Isto torna o diclofenaco um potencial candidato no tratamento oncológico, seja na combinação com tratamentos já estabelecidos ou com coquetéis contendo novos fármacos, aumentando a necessidade de pesquisa em plataformas de liberação simultânea de fármacos.

2. Objetivos

O objetivo deste capítulo consiste no estudo de liberação simultânea de diclofenaco de potássio pela matriz de hidrogel de gelatina reticulado por reações de Diels-Alder contendo nanopartículas de mPEG-co-PCL encapsuladas com metotrexato. Os objetivos específicos incluem:

- Avaliar o comportamento reológico do hidrogel com a incorporação de nanopartículas poliméricas;
- Avaliar o perfil de liberação simultânea dos fármacos modelo.

3. Procedimento experimental

Nesta etapa a amostra de hidrogel HDA_1:1 obtida no capítulo 1 e as nanopartículas de mPEG-co-PCL 1:30 obtidas no capítulo 2 foram utilizadas como plataforma de liberação simultânea de diclofenaco e de potássio e metotrexato, respectivamente. Os polímeros precursores do hidrogel HDA_1:1 foram dispersos em 300,0 uL de tampão fosfato (pH 7,4). As nanopartículas de mPEG-co-PCL 1:30 contendo metotrexato foram dispersas sobre os precursores antes do início da reticulação, nas proporções 1,0%, 5,0% e 10,0% (massa/massa). O material foi mantido a 65,0 °C durante 48,0 horas para a reticulação do hidrogel e liofilizado na sequência. Após a amostra ser liofilizada,

300 μL de uma solução 23,3 mg mL^{-1} de diclofenaco de potássio (aproximadamente 5% em relação a massa de polímero) foi adicionada sobre o hidrogel, que permaneceu por 12 horas para absorção do fármaco. Após este período a amostra foi liofilizada novamente para posterior teste de liberação, conforme pode ser observado no esquema da Figura 53.

Os testes de liberação controlada do metotrexato e diclofenaco de potássio foram conduzidos em tampão fosfato, à 37,0 $^{\circ}\text{C}$. As concentrações dos fármacos foram determinadas a partir das curvas padrões obtidas por espectroscopia UV-Vis, no qual foi utilizado o comprimento de onda de 276 nm para quantificação do diclofenaco de potássio e 372 nm para a quantificação de metotrexato. Embora a banda de absorção em 372 nm apresente a menor intensidade frente as demais bandas características do metotrexato, é o sinal mais afastado da banda característica do diclofenaco de potássio, permitindo que não tenha interferência nos sinais durante a quantificação simultânea dos fármacos.

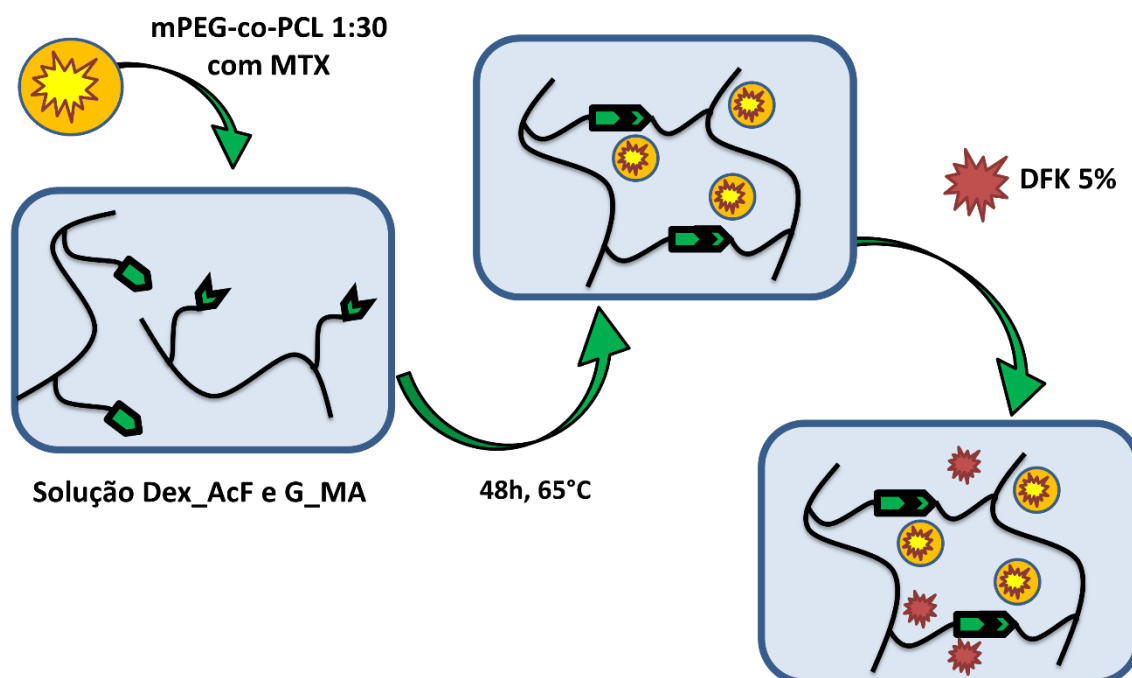


Figura 53. Esquema do procedimento experimental para obtenção de sistema de liberação simultânea.

4. Resultados e discussão

A presença de nanopartículas de mPEG-co-PCL na matriz de hidrogel de gelatina foi avaliada por imagens de microscopia eletrônica de varredura, como pode ser observado na Figura 54. As imagens na coluna da esquerda foram obtidas com menor magnificação, sendo possível observar que a estrutura porosa do hidrogel foi mantida. Na coluna da direita, as imagens foram ampliadas para atingir resolução adequada para observar as nanopartículas de mPEG-co-PCL, cuja morfologia corresponde a esferas irregulares sobre a estrutura do hidrogel, sendo facilmente identificadas para as amostras contendo 5,0 e 10,0% de nanopartículas. Para as amostras contendo 1,0% não foi possível observar a presença de nanopartículas, entretanto os resultados de liberação indicam a presença de metotrexato.

A propriedade reológica dos hidrogéis foi avaliada em função da porcentagem de nanopartículas de mPEG-co-PCL adicionada. Como pode ser observado na Figura 55, os valores de G' e G'' são independentes da frequência aplicada, indicando que não ocorre variação da característica viscoelástica das amostras na faixa avaliada, mantendo sua estrutura de um gel sólido. Entretanto o aumento da porcentagem de nanopartículas dispersa no hidrogel resulta em módulo elástico de, aproximadamente, 3, 10 e 18 vezes maiores para as amostras contendo 1, 10 e 5%, respectivamente. A presença das nanopartículas enrijecem o hidrogel e este comportamento pode ser atribuído as interações entre as cadeias do hidrogel e do PEG presente na superfície das nanopartículas, aumentando as propriedades elásticas do sistema. Era esperado que a amostra contendo 10% de nanopartículas apresentasse maior valor do módulo elástico, quando comparado a amostra contendo 5%. Esta diminuição pode estar relacionada a baixa homogeneidade na distribuição das nanopartículas no interior do hidrogel, embora não se tenha observado este fenômeno nas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

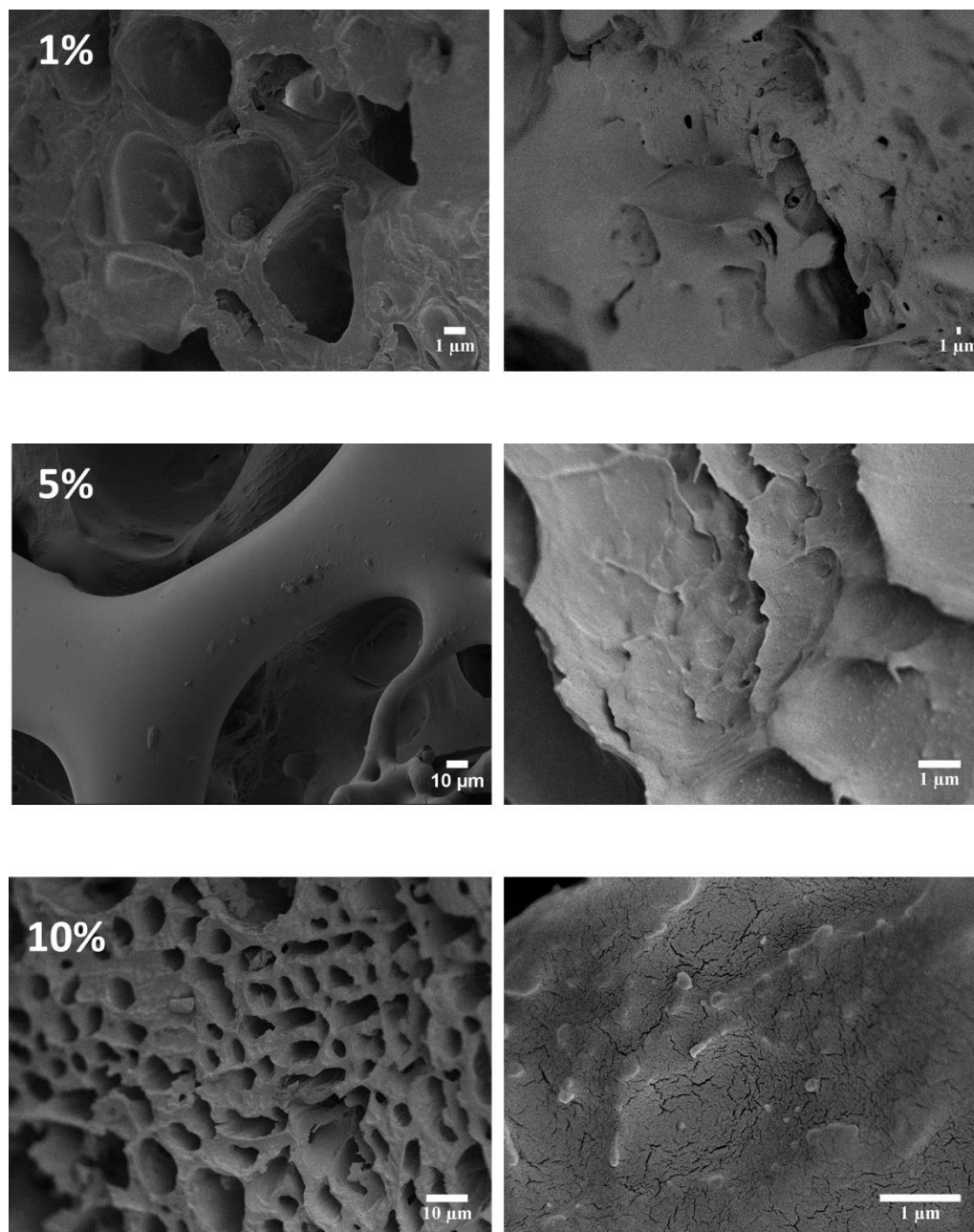


Figura 54. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas incorporadas ao hidrogel.

O perfil de liberação simultânea de MTX e DFK a partir do sistema duplo hidrogel/nanopartícula polimérica pode ser observado na Figura 56. A liberação do DFK apresentou o mesmo comportamento para as três amostras avaliadas, resultando em uma liberação rápida, atingindo 100% do fármaco hidrofílico em apenas cinco horas. Já o MTX apresentou um comportamento de liberação sustentado, no qual a partir de 8 horas não é mais observado aumento de sua liberação.

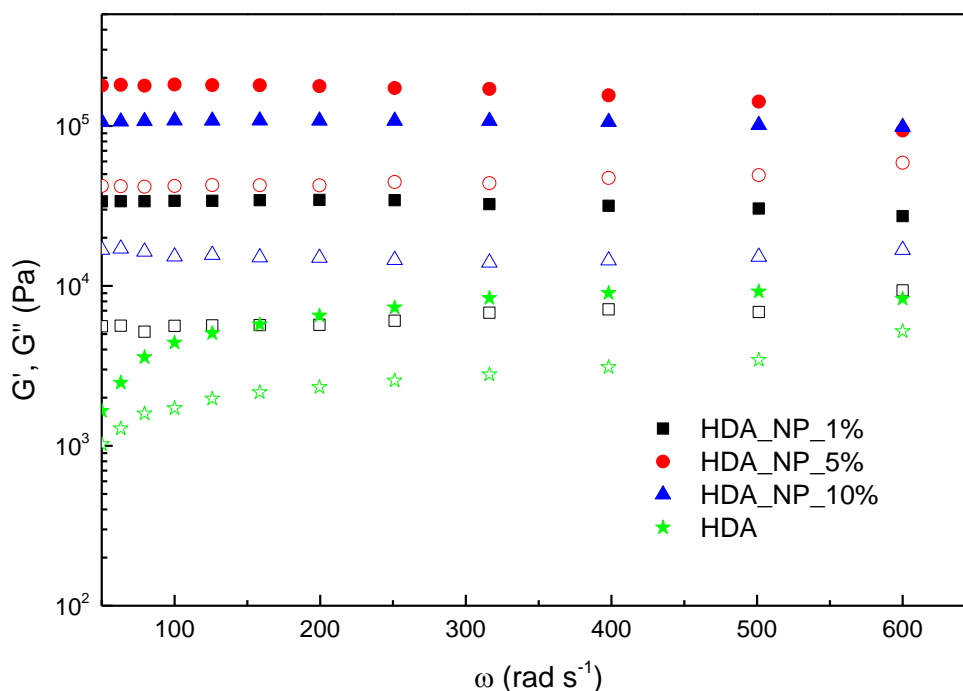


Figura 55. Varredura de frequência de nanopartículas polimérica incorporadas ao hidrogel de gelatina reticulado por reações de Diels – Alder. G' – símbolo fechado. G'' – símbolo aberto.

Com base no comportamento distinto entre as liberações de DFK e MTX na plataforma simultânea hidrogel/nanopartícula, é possível observar o mecanismo frente as propriedades físico-químicas de cada fármaco em relação a plataforma de liberação. O hidrogel intumescido com tampão fosfato permite a dissolução completa e rápida do fármaco hidrofílico DFK com o meio de dissolução. A dispersão das nanopartículas de mPEG-co-PCL sobre o hidrogel também se mostrou homogênea devido a camada externa do copolímero ser composta do segmento hidrofílico – PEG. Isto é, a permeação do fármaco hidrofóbico MTX não é prejudicada devido a nanopartícula de copolímero para que, na sequência, seja eliminada pela matriz de hidrogel, reduzindo sua velocidade de liberação, conforme pode ser observado pela diminuição das constantes de velocidade apresentada na Figura 57 e resumidos na Tabela 16.

Analisando o expoente de liberação n para os fármacos, o DFK é liberado por mecanismos de difusão, uma vez que os valores obtidos foram inferiores a 0,45. Para o MTX, foi considerado a plataforma mais externa, isto

é, a geometria cilíndrica do hidrogel, cujo valor de n obtido foi superior a 0,89, indicando que o mecanismo ocorre pelo transporte de caso II. Para todas as amostras o coeficiente de correlação obtido permite o uso da equação de Peppas para descrever a cinética de liberação deste sistema.

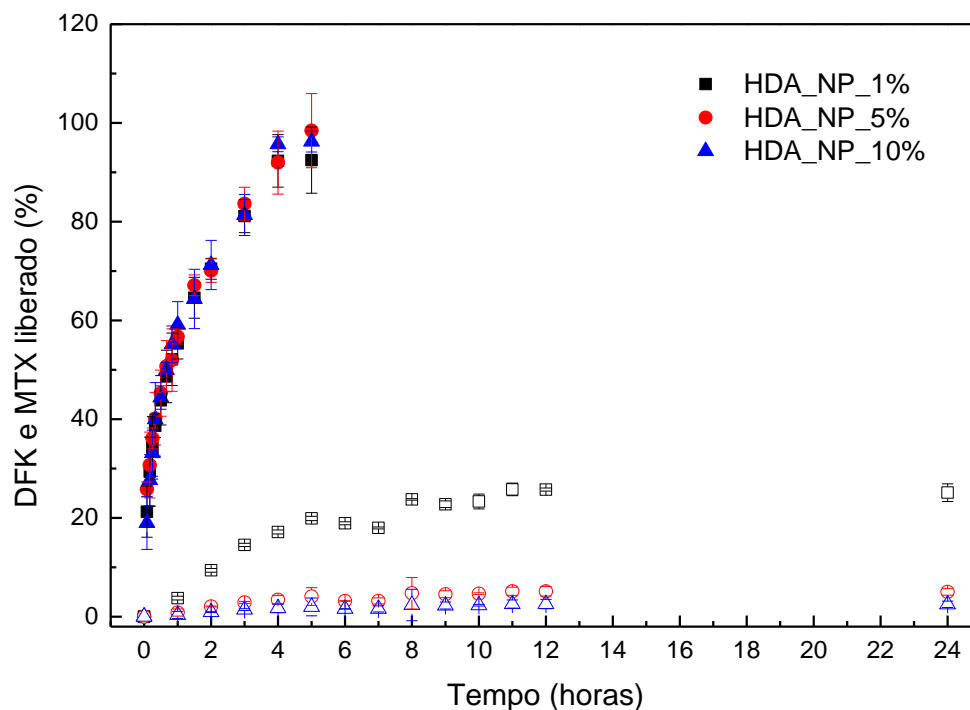


Figura 56. Curvas de liberação de DFK (símbolo cheio) e MTX (símbolo vazio) de sistemas duplos de liberação de fármacos.

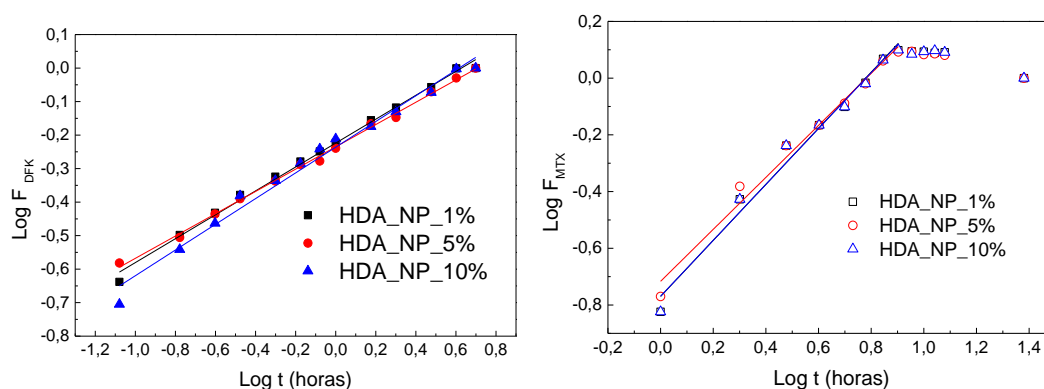


Figura 57. Curva bi-logarítmica da fração de diclofenaco e metotrexato liberado em função do tempo da plataforma simultânea de liberação.

Tabela 16. Parâmetros obtidos da curva cinética de liberação de diclofenaco e metotrexato da plataforma simultânea de liberação

Amostra	Fármaco	n	k (h ⁻¹)	R ²
HDA_NP_1%		0,35	0,598	0,997
HDA_NP_5%	DFK	0,33	0,582	0,998
HDA_NP_10%		0,38	0,580	0,992
HDA_NP_1%		0,988	0,169	0,992
HDA_NP_5%	MTX	0,916	0,192	0,992
HDA_NP_10%		0,985	0,170	0,992

5. Conclusões parciais

A partir da combinação de plataformas de liberação de fármacos distintas é possível desenvolver um sistema simultâneo, no qual fármacos com características hidrofílicas e hidrofóbicas podem estar presentes em uma única matriz. Foi desenvolvido um compósito no qual nanopartículas de mPEG-co-PCL foram encapsuladas por um hidrogel a base de gelatina. As nanopartículas poliméricas facilitaram a incorporação de metotrexato, fármaco com características hidrofóbicas, na plataforma dupla enquanto o hidrogel de gelatina foi intumescido com diclofenaco de potássio, fármaco que apresenta elevada hidrofiliabilidade. Foi observado que o DFK apresentou rápida liberação da matriz de hidrogel de gelatina, enquanto que a liberação do MTX é controlada pela degradação do segmento hidrofóbico do copolímero, apresentando um comportamento sustentado.

6. Conclusões

A gelatina e a dextrana foram modificadas para a inserção de grupos dienos e dienófilos sobre suas estruturas poliméricas para a obtenção de hidrogéis reticulados quimicamente por reações click de Diels – Alder. Os hidrogéis apresentaram capacidade de intumescimento distinta em função dos meios de dissolução estudados. A liberação de diclofenaco de potássio – fármaco hidrofílico, foi realizada nas mesmas soluções do estudo de intumescimento, no qual foi observado maior velocidade de liberação do fármaco nos meios de dissolução que apresentaram maior capacidade de intumescimento.

Para o carregamento de metotrexato, fármaco hidrofóbico, nanopartículas poliméricas de copolímero mPEG-co-PCL foram obtidas pelo método da emulsão por evaporação de solvente. O perfil de liberação do metotrexato pode ser controlado em função do tamanho de cadeia do segmento hidrofóbico do copolímero, no qual as plataformas obtidas com maior segmento hidrofóbico são as que apresentam menor porcentagem de liberação. Devido à forte interação entre o metotrexato com o PCL, a liberação do fármaco fica subordinada a degradação do polímero pelo organismo.

Plataforma de liberação simultânea de fármacos foi obtida a partir da dispersão de nanopartículas polimérica sobre uma matriz de hidrogel. O metotrexato encapsulado pelas nanopartículas de mPEG-co-PCL foi disperso no hidrogel antes de sua reticulação, enquanto o diclofenaco foi adsorvido pelo hidrogel durante a etapa de intumescimento. A liberação simultânea resultou em uma rápida liberação para diclofenaco de potássio e uma liberação sustentada para o metotrexato, liberação controlada pela degradação das nanopartículas poliméricas, indicando a capacidade de controlar a entrega de fármaco a partir da escolha da plataforma utilizada.

7. Perspectivas futuras

Os itens listados abaixo devem ser considerados como guias para continuação deste trabalho:

- Alterar condições de síntese para aumentar a modificação da gelatina;
- Estudar as propriedades térmicas do hidrogel;
- Testar a biocompatibilidade do hidrogel;
- Avaliar a liberação simultânea em outros meios de dissolução.

REFERENCIAS

- 1 Nanomedicine European Technology Platform. **Nanomedicine in cancer**. Disponível em: < <http://www.etp-nanomedicine.eu/public/about-nanomedicine/nanomedicine-in-cancer> >. Acesso em: 19 fev. 2018.
- 2 FLEIGE, E.; QUADIR, M. A; et al. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 9, p. 866–84, 2012.
- 3 NELSON, A. Engineering interactions. **Nature Materials**, v. 7, p. 523–525, 2008.
- 4 HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, 2012.
- 5 BUENGER, D.; TOPUZ, F.; et al. Hydrogels in sensing applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 1678–1719, 2012.
- 6 BUWALDA, S.J.; BOERE, K.W.M.; et al. Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 254–73, 2014.
- 7 FLORY, P.J.; REHNER, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 11, n. 11, p. 521–526, 1943.
- 8 FLORY, P.J.; REHNER, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks I. Rubberlike Elasticity. **The Journal of Chemical Physics**, v. 11, n. 11, p. 512–520, 1943.
- 9 PEPPAS, N.A.; BURES, P.; et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.
- 10 MANADAS, R.; PINA, M.E.; et al. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas**, v. 38, p. 375–399, 2002.
- 11 MANADAS, R.; PINA, M.E.; et al. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375–399, 2002.
- 12 RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A Simple Equation for Description of Solute Release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23–36, 1987.
- 13 MENG, X.; EDGAR, K.J. “Click” reactions in polysaccharide modification. **Progress in Polymer Science**, p. ASAP, 2015.
- 14 CLERCQ, K. DE; SCHELFHOUT, C.; et al. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a strategy to prevent postsurgical peritoneal adhesions: In vitro and in vivo characterization. **Biomaterials**, v. 96, p. 33–46, 2016.
- 15 GANGULY, K.; CHATURVEDI, K.; et al. Polysaccharide-based micro/nanohydrogels for delivering macromolecular therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 162–173, 2014.

- 16 ELZOGHBY, A.O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 1075–91, 2013.
- 17 HOU, L.; WU, P. Comparison of LCST-transitions of homopolymer mixture, diblock and statistical copolymers of. **Soft Matter**, v. 11, p. 2771–2781, 2015.
- 18 HOCINE, S.; LI, M.H. Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water. **Soft Matter**, v. 9, n. 25, p. 5839, 2013.
- 19 JIANG, X.; ZHAI, S.; et al. Synthesis of PAA-g-PNIPAM well-defined graft polymer by sequential RAFT and SET-LRP and its application in preparing size-controlled super-paramagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as a stabilizer. **Polymer**, v. 55, p. 3703–3712, 2014.
- 20 CHEN, J.; LIU, M.; et al. Self-assembly behavior of pH- and thermo-responsive hydrophilic ABCBA-type pentablock copolymers synthesized by consecutive RAFT polymerization. **RSC Advances**, v. 3, p. 15085, 2013.
- 21 JIANG, Y.; CHEN, J.; et al. Click hydrogels, microgels and nanogels: emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 35, p. 4969–4985, 2014.
- 22 SUCH, G.K.; JOHNSTON, A.P.R.; et al. Synthesis and functionalization of nanoengineered materials using click chemistry. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 985–1003, 2012.
- 23 NINH, C.; BETTINGER, C.J. Reconfigurable Biodegradable Shape-Memory Elastomers via Diels – Alder Coupling. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2162–2170, 2013.
- 24 GANDINI, A. (2013). The furan/maleimide Diels-Alder reaction: A versatile click-unclick tool in macromolecular synthesis. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1–29.
- 25 NIMMO, C.M.; OWEN, S.C.; et al. Diels - Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 824–830, 2011.
- 26 WEI, H.L.; YANG, Z.; et al. Facile preparation of poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels via aqueous Diels-Alder click reaction. **Polymer**, v. 51, n. 8, p. 1694–1702, 2010.
- 27 DANIELE, M.A.; ADAMS, A.A.; et al. Biomaterials Interpenetrating networks based on gelatin methacrylamide and PEG formed using concurrent thiol click chemistries for hydrogel tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 35, p. 1845–1856, 2014.
- 28 LIN, H.; OU, J.; et al. Facile construction of macroporous hybrid monoliths via thiol-methacrylate Michael addition click reaction for capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1379, p. 34–42, 2015.
- 29 ZIMMERMANN, A.; HORAK, J.; et al. Surface-crosslinked poly(3-mercaptopropyl)methylsiloxane-coatings on silica as new platform for low-bleed mass spectrometry-compatible functionalized stationary phases synthesized via thiol-ene click reaction. **Journal of Chromatography A**, v. 1436, p. 73–83, 2016.

- 30 CIGANEK, E. The Intramolecular Diels-Alder Reaction. **Organic reactions**, v. 32, p. 1–374, 1984.
- 31 BROCKSOM, T.J.; DONATONI, M.C.; et al. A reação de Diels-Alder no início do século vinte um. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2211–2218, 2010.
- 32 CAREY, F.A. The Diels-Alder reaction. In: **Organic Chemistry**. 2000, p. 1275.
- 33 McGRATH, J.E., HICKNER, M.A., et al. Polymers for a sustainable environment and green energy. In: **Polymer Science: a comprehensive reference**. v.10.2013, p. 849.
- 34 SANTORO, M.; TATARA, A.M.; et al. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 210–218, 2014.
- 35 NGUYEN, A.H.; MCKINNEY, J.; et al. Gelatin methacrylate microspheres for controlled growth factor release. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p. 101–110, 2015.
- 36 DJABOUROV, M.; LEBLOND, J.; et al. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. **Journal de Physique**, v. 49, p. 319–332, 1988.
- 37 MEHVAR, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. **Journal of Controlled Release**, v. 69, n. 1, p. 1–25, 2000.
- 38 COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5–24, 2007.
- 39 PARK, K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3–8, 2014.
- 40 LIU, J.; HUANG, Y.; et al. Ph-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 11, p. 693–710, 2013.
- 41 JHAVERI, A.; DESHPANDE, P.; et al. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 352–370, 2014.
- 42 BRÜLISAUER, L.; GAUTHIER, M.A.; et al. Disulfide-containing parenteral delivery systems and their redox-biological fate. **Journal of Controlled Release**, p. 6–13, 2014.
- 43 EJAZ, M.; YU, H.; et al. Evaluation of redox-responsive disulfide cross-linked poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. **Polymer**, v. 52, n. 23, p. 5262–5270, 2011.
- 44 CHENG, W.; GU, L.; et al. Stimuli-responsive polymers for anti-cancer drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, 2014.
- 45 CHAU, Y., ZHONG, J., et al. Enzyme-Sensitive Biomaterials for Drug Delivery. In: **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2011, p. 605–624.
- 46 TA, T.; CONVERTINE, A.J.; et al. Thermosensitive Liposomes Modified with Poly (N -isopropylacrylamide- co -propylacrylic acid) Copolymers for Triggered Release of Doxorubicin. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 1915–1920, 2010.

- 47 XIONG, W.; WANG, W.; et al. Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy. **Colloids and surfaces B** biointerfaces, v. 84, n. 2, p. 447–53, 2011.
- 48 CHENG, C.; WEI, H.; et al. Thermo-triggered and biotinylated biotin-P(NIPAAm-co-HMAAm)-b-PMMA micelles for controlled drug release. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 88, n. 3, p. 814–22, 2009.
- 49 STRONG, L.; DAHOTRE, S.; et al. Hydrogel-nanoparticle composites for optically modulated cancer therapeutic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 178, p. 63–68, 2014.
- 50 BERRY, C.C.; CURTIS, A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. R198–R206, 2003.
- 51 PANKHURST, Q. A; CONNOLLY, J.; et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R167–R181, 2003.
- 52 TARTAJ, P. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 182, p. R182–R197, 2003.
- 53 DEATSCH, A.E.; EVANS, B.A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 354, p. 163–172, 2014.
- 54 GAN, T.J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. **Current Medical Research and Opinion**, v. 26, n. 7, p. 1715–1731, 2010.
- 55 VANE, J.R. Inhibition of Prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 231, p. 232–235, 1971.
- 56 DENG, H.; LIU, J.; et al. PEG-b-PCL copolymer micelles with the ability of pH-controlled negative-to-positive charge reversal for intracellular delivery of doxorubicin. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 11, p. 4281–4292, 2014.
- 57 ELOMAA, M.; ASPLUND, T.; et al. Determination of the degree of substitution of acetylated starch by hydrolysis, ¹H NMR and TGA/IR. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 3, p. 261–267, 2004.
- 58 ZHANG, Z.; CHEN, P.; et al. Effects of amylose content on property and microstructure of starch-graft-sodium acrylate copolymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 453–459, 2014.
- 59 ALIEV, A.E. Solid-state NMR studies of collagen-based parchments and gelatin. **Biopolymers**, v. 77, n. 4, p. 230–245, 2005.
- 60 MUKHERJEE, I.; ROSOLEN, M. Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 3, p. 1161–1166, 2013.

- 61 RAHMAN, M.S.; AL-SAIDI, G.; et al. Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. **Thermochimica Acta**, v. 509, p. 111–119, 2010.
- 62 DAI, C.A.; LIU, M.W. The effect of crystallinity and aging enthalpy on the mechanical properties of gelatin films. **Materials Science and Engineering A**, v. 423, n. 1–2, p. 121–127, 2006.
- 63 SEYMOUR, FRED R. KNAPP, ROGER D. BISHOP, S.H. Determination of the structure of dextran by ¹³C-Nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 51, p. 179–194, 1976.
- 64 WOLF, F.A.; KELLER, R.C.A. Characterization of helical structures in gelatin networks and model polypeptides by circular dichroism. **Gels**, v. 14, p. 9–14, 1996.
- 65 DJABOUROV, M.; PAPON, P. Influence of thermal treatments on the structure and stability of gelatin gels. **Polymer**, v. 24, n. 5, p. 537–542, 1983.
- 66 GARCÍA-ASTRAIN, C.; GANDINI, A.; et al. Diels–Alder “click” chemistry for the cross-linking of furfuryl-gelatin-polyetheramine hydrogels. **RSC Advances**, v. 4, n. 67, p. 35578, 2014.
- 67 MATSUO, T. Nature of the Longest Wavelength Absorption of N-Substituted Maleimides. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 38, p. 557–562, 1965.
- 68 SILVESTRI, M.G.; DILLS, C.E. A kinetic study of the Diels-Alder reaction: An experiment illustrating simple second-order reaction kinetics. **Journal of Chemical Education**, v. 66, n. 8, p. 690, 1989.
- 69 KANG, H.W.; TABATA, Y.; et al. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. 14, p. 1339–1344, 1999.
- 70 HOARE, T.R.; KOHANE, D.S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008.
- 71 YU, F.; CAO, X.; et al. An interpenetrating HA / G / CS biomimic hydrogel via Diels – Alder click chemistry for cartilage tissue engineering. **Carbohydrate polymers**, v. 97, p. 188–195, 2013.
- 72 GARCÍA-ASTRAIN, C.; GANDINI, A.; et al. Green chemistry for the synthesis of methacrylate-based hydrogels crosslinked through Diels-Alder reaction. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 12, p. 3998–4007, 2013.
- 73 VANDERHOOFT, J.; ALCOUTLABI, M.; et al. Rheological Properties of Cross-Linked Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 20–28, 2009.
- 74 KUMAR, C.S.S.R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 9, p. 789–808, 2011.
- 75 Procter, H.R.; Wilson, J. Arthur The acid-gelatin equilibrium. **Journal of the Chemical Society**, v. 109, p. 307–319, 1916.

- 76 FU, Y.; KAO, W.J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.
- 77 KAMALY, N.; YAMEEN, B.; et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.
- 78 LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 198–214, 2013.
- 79 KHADKA, P.; RO, J.; et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 304–316, 2014.
- 80 BERTRAND, N. & LEROUX, J.C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p.152–163, 2012.
- 81 BANIK, B.L.; FATTAHI, P.; et al. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271–299, 2016.
- 82 DIAS, A.M.G.C.; HUSSAIN, A.; et al. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 142–55, 2011.
- 83 BERTRAND, N.; WU, J.; et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2–25, 2014.
- 84 CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 640–65, 2012.
- 85 Alexis, F.; Pridgen, E.; et al. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 505–515, 2008.
- 86 Rao, J.P.; Geckeler, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887–913, 2011.
- 87 Lehigh University (United States of America) Vanderhoff, J.W., Ugelstad, J., & El-Aasser, M.S. Polymer emulsification process. **US4177177A**. 27 jan. 1978, 04 dec. 1979.
- 88 MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; et al. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.
- 89 ASUA, J.M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 1283–1346, 2002.
- 90 ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689–757, 2002.

- 91 BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; et al. 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.
- 92 KERMABON-AVON, G.; BRESSY, C.; et al. Statistical design strategies to optimize properties in miniemulsion polymerization of methyl methacrylate. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 4, p. 1208–1216, 2009.
- 93 ALBANESE, A.; TANG, P.S.; et al. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2012.
- 94 LI, Z.; TAN, B.H. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers: molecular design, self-assembly and biomedical applications. **Materials Science & Engineering. C: materials for biological applications**, v. 45, p. 620–634, 2014.
- 95 ELSABAHY, M.; WOOLEY, K.L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2545–2561, 2013.
- 96 WEI, X.; GONG, C.; et al. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 1, p. 1–18, 2009.
- 97 HELZER, J.E.; ROBINS, L.N.; et al. The Pharmacology and clinical use of methotrexate. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 26, p. 1630–4, 1987.
- 98 SCOTT, J.M.; WEIR, D.G. Folic Acid, Homocysteine and One-Carbon Metabolism: A Review of the Essential Biochemistry. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 5, n. 4, p. 223–227, 1998.
- 99 GORLICK, R. Methotrexate, its mechanism of action in malignant disease and mechanisms of resistance by malignant cells. In: **Methotrexate**. Basel: Birkhäuser Basel, 2000, p. 9–29.
- 100 WONG, P.T.; CHOI, S.K. Mechanisms and implications of dual-acting methotrexate in folate-targeted nanotherapeutic delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1772–90, 2015.
- 101 SOUZA, M.A.; SANTOS, H.T.; et al. Magnetic Nanoparticles Surface Modified with Biodegradable Polymers for Controlled Methotrexate Delivery in Cancer Therapy. **Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery**, v. 3, p. 77–84, 2016.
- 102 PIAZZA, R.D.; NUNES, E. da S.; et al. Magnetic nanohydrogel obtained by miniemulsion polymerization of poly(acrylic acid) grafted onto derivatized dextran. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 378–385, 2017.
- 103 SEO, D.-H.; JEONG, Y.-I.; et al. Methotrexate-incorporated polymeric nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 69, n. 2, p. 157–63, 2009.

- 104 LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.
- 105 MEEROD, S.; TUMCHARERN, G.; et al. Magnetite nanoparticles stabilized with polymeric bilayer of poly(ethylene glycol) methyl ether-poly(ϵ -caprolactone) copolymers. **Polymer**, v. 49, n. 18, p. 3950–3956, 2008.
- 106 PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., et al. Infrared Spectroscopy. In: **Introduction to Spectroscopy: a guide for student of organic chemistry**. South Melbourne: Thomson Learning, 2001, p. 579.
- 107 KEMALA, T.; BUDIANTO, E.; et al. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, p. 103–108, 2012.
- 108 AZOUZ, L.; DAHMOUNE, F.; et al. Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres. **Materials Science & Engineering. C: materials for biological applications**, v. 58, p. 412–419, 2016.
- 109 ISLAM, A.M.; CHOWDHRY, B.Z.; et al. Heteroaggregation in colloidal dispersions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 62, p. 109–136, 1995.
- 110 ZHANG, C.; CHEN, X.; et al. Mechanism and Kinetics of Drug Release from Poly(ϵ -Caprolactone) Based Extrudates Prepared By Hot-Melt Extrusion. **Journal of Macromolecular Science part B**, v. 55, n. 3, p. 285–298, 2016.
- 111 SINHA, V.R.; BANSAL, K.; et al. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23, 2004.
- 112 KARAMI, Z.; SADIGHIAN, S.; et al. Naproxen conjugated mPEG-PCL micelles for dual triggered drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 665–673, 2016.
- 113 SCIENCES, H.; SUVAKANTA DASH, P.N.M.; et al. Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery System. **Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.
- 114 RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23–36, 1987.
- 115 HICKEY, J.W.; SANTOS, J.L.; et al. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 535–547, 2015.
- 116 CRUCHO, C.I.C.; BARROS, M.T. Formulation of Functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. **Polymer**, v. 68, p. 41–46, 2015.
- 117 MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 569–578, 2015.

- 118 GUPTA, U., PERUMAL, O. Dendrimers and its biomedical applications. In: **Natural and Synthetic Biomedical Polymers**. Elsevier Inc., 2014, p. 243–257.
- 119 WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90–99, 2010.
- 120 ZHOU, S. Actively targeted delivery of anticancer drug to tumor cells by redox-responsive star-shaped micelles. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8711–8722, 2014.
- 121 KIM, J.O.; KABANOV, A. V; et al. Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 3, p. 197–204, 2009.
- 122 HAMIDI, M.; AZADI, A.; et al. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.
- 123 FAN, T.; LI, M.; et al. Preparation of thermoresponsive and pH-sensitivity polymer magnetic hydrogel nanospheres as anticancer drug carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 2, p. 593–600, 2011.
- 124 SARIKA, P.R.; KUMAR, P.R.A.; et al. Nanogels based on alginic aldehyde and gelatin by inverse miniemulsion technique : synthesis and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 118–125, 2015.
- 125 ARYAL, S.; HU, C.M.J.; et al. Combinatorial drug conjugation enables nanoparticle dual-drug delivery. **Small**, v. 6, n. 13, p. 1442–1448, 2010.
- 126 NUMATA, K.; YAMAZAKI, S.; et al. Biocompatible and biodegradable dual-drug release system based on silk hydrogel containing silk nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1383–1389, 2012.
- 127 WEI, L.; CAI, C.; et al. Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites. **Biomaterials**, v. 30, n. 13, p. 2606–2613, 2009.
- 128 XIAO, W.; ZENG, X.; et al. Dual stimuli-responsive multi-drug delivery system for individual controlled release of anti-cancer drugs. **Chemical Communications**, v. 51, p. 1475–1478, 2015.
- 129 YAN, S.; XIAOQIANG, L.; et al. Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 376–381, 2009.
- 130 MOORE, N.; POLLACK, C.; et al. Adverse drug reactions and drug – drug interactions with over-the-counter NSAIDs. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 11, p. 1061–1075, 2015.
- 131 PETERSON, I. H. Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization. Experimental studies in the rat. **Invasion Metastasis**, v. 3, p. 151–159, 1983.
- 132 PANTZIARKA, P.; SUKHATME, V.; et al. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—diclofenac as an anti-cancer agent. **Ecancermedicalscience**, v. 10, p. 1–28, 2016.