

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 20/04/2020.

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 GPC	58
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).

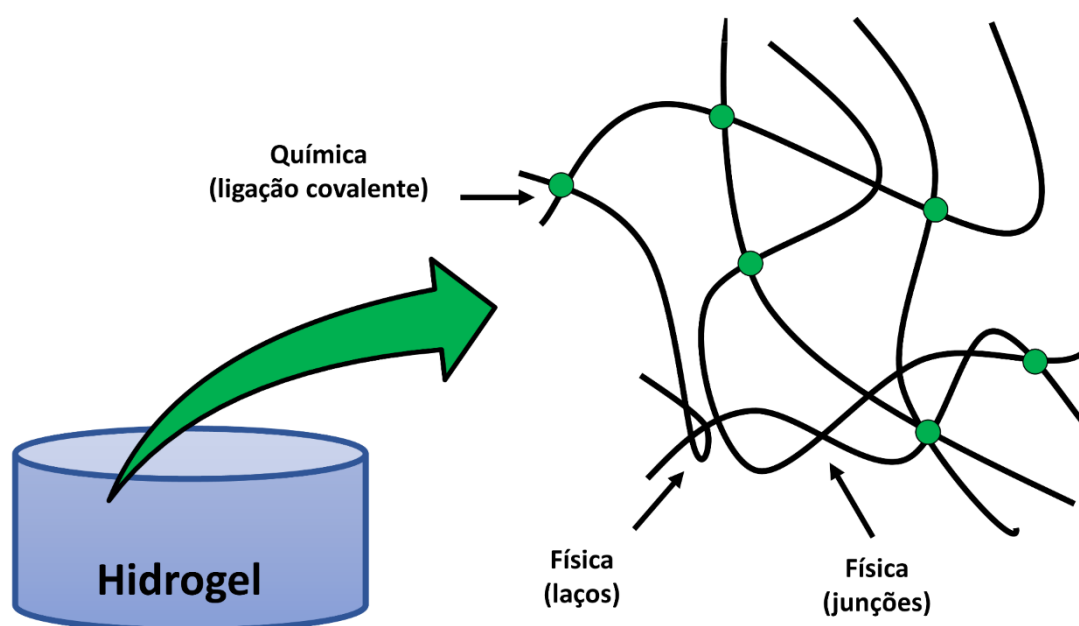


Figura 1. Representação esquemática dos tipos de reticulação. Adaptado de (5)

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

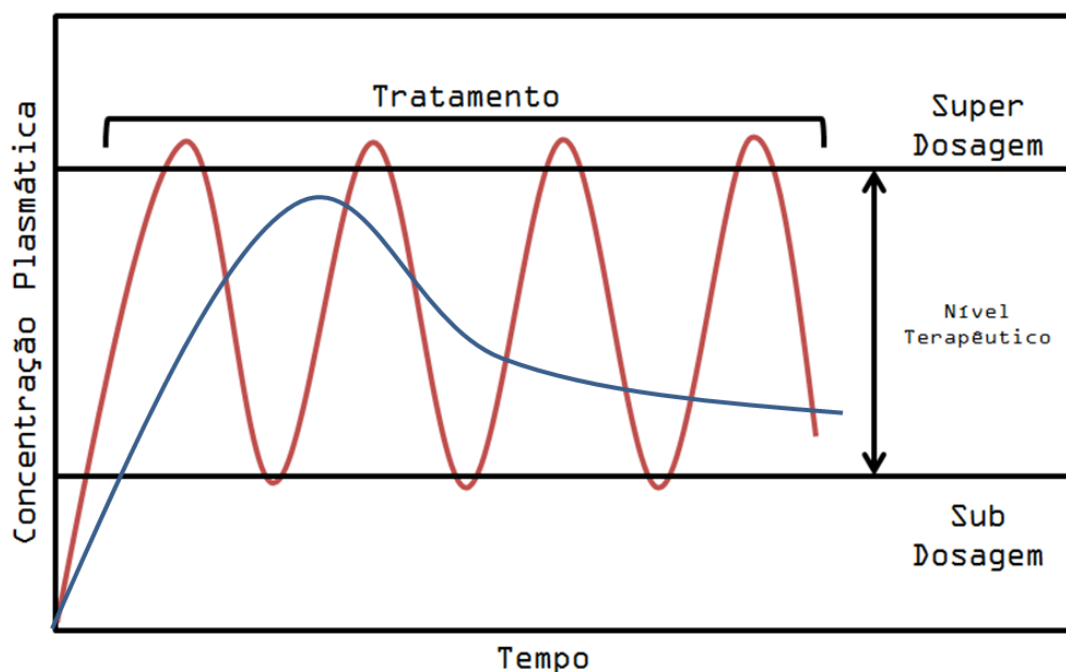


Figura 2. Sistemas de liberação convencionais (vermelho) e controlados (azul).

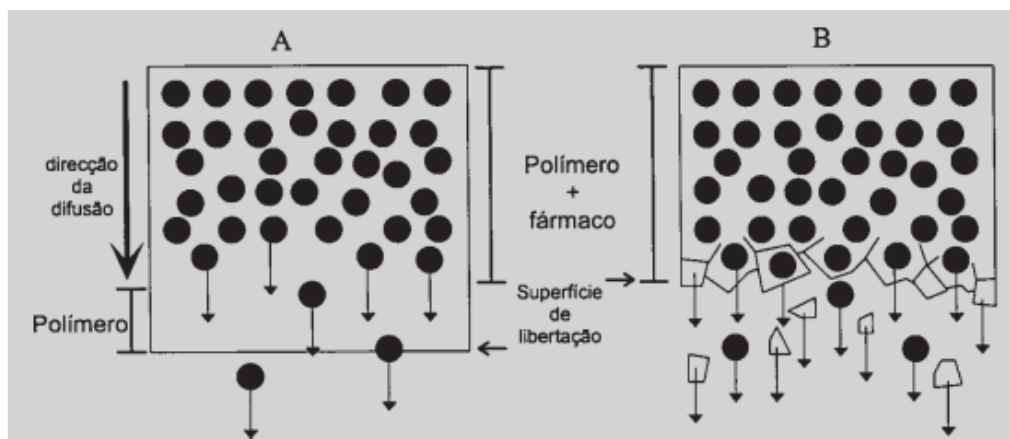


Figura 3. Esquema da difusão (A) e erosão (B) de fármacos em uma matriz polimérica sólida. Adaptado de (10).

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)

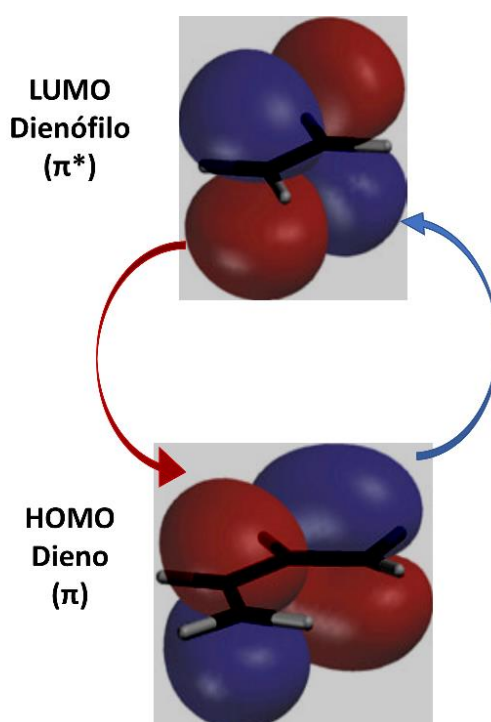


Figura 4. Esquema das interações entre os orbitais moleculares na formação do aduto de Diels-Alder. Adaptado de (32).

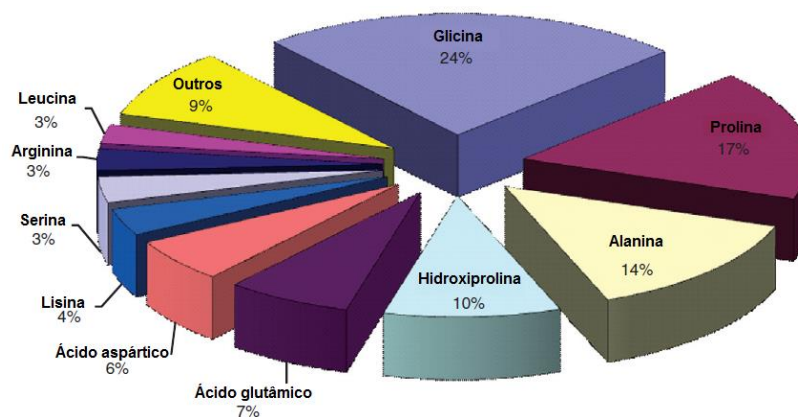


Figura 5. Distribuição dos aminoácidos que constituem a gelatina. Adaptado de (33).

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).

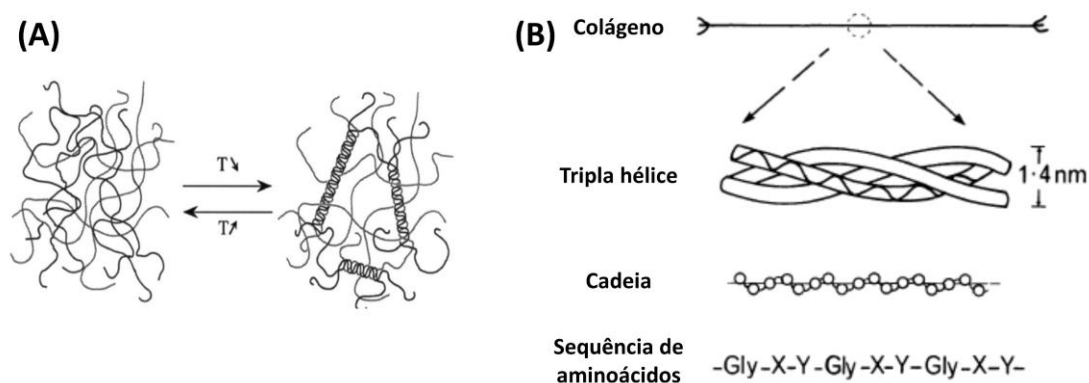


Figura 6. (A) Efeito de transição sol – gel de gelatina. (B) Estrutura do colágeno em diferentes níveis moleculares. Adaptado de (36) .

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,

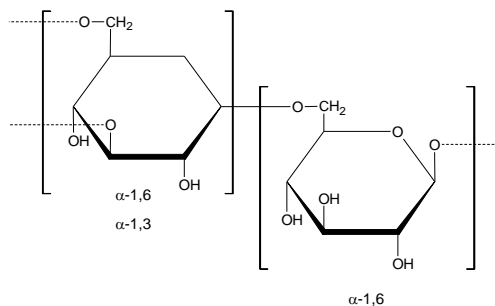


Figura 7. Representação da estrutura da dextrana.

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

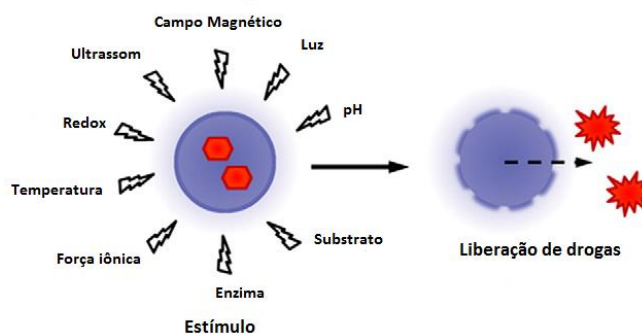


Figura 8. Esquema de liberação controlada de fármacos em função de estímulos. Adaptado de (36).

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 glutathione (GSH) 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 glutathione (GSH) como agente redutor, foi possível confirmar a ruptura da ligação do dissulfeto, liberando moléculas modelos. Estudos em células de cultura resultaram que a fármaco

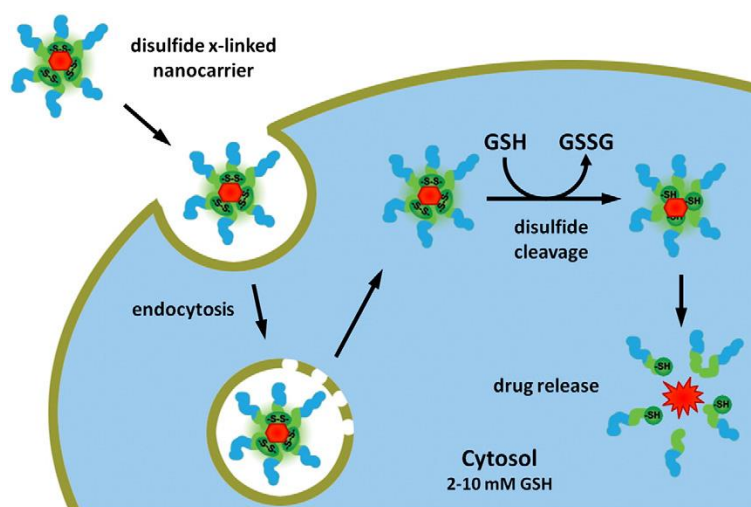


Figura 9. Esquema do mecanismo de ação sensível à variação de potencial redox. Adaptado de (38).

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.

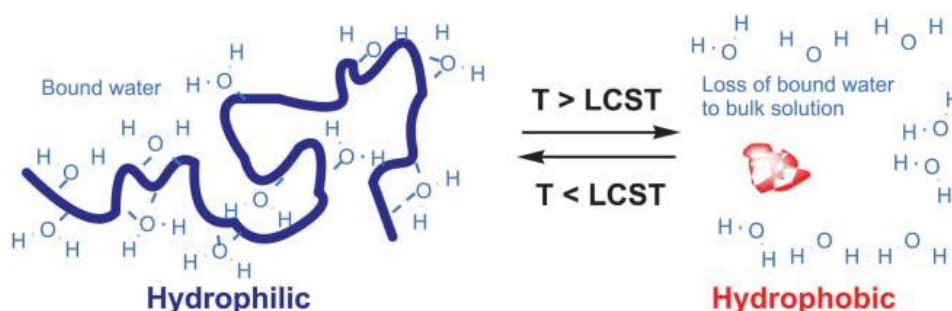


Figura 10. Esquema de transição sol – gel para polímeros termossensíveis. Adaptado de (48).

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.

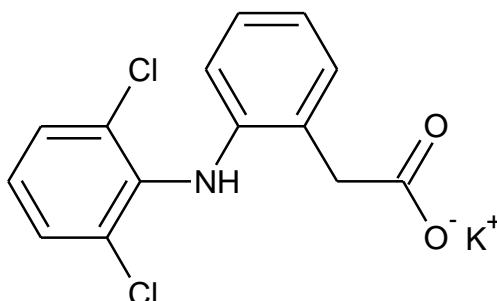


Figura 11. Representação da estrutura molecular do diclofenaco de potássio.

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.

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.