

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química – Campus de Araraquara

João Victor Brandt

Preparação de copolímeros PEG-PCL modificado com ácido fólico para liberação controlada de metotrexato.

Araraquara

2016

João Victor Brandt

Preparação de copolímero PEG-PCL modificado com ácido fólico para liberação controlada de metotrexato.

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharelado em Química

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques.

Araraquara

2016

JOÃO VICTOR BRANDT

Preparação de copolímero PEG-PCL modificado com ácido fólico para liberação controlada de metotrexato.

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharelado em Química.

Araraquara, 20 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques (Orientador): \_\_\_\_\_

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior: \_\_\_\_\_

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Helena Pulcinelli: \_\_\_\_\_

Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, João Carlos e Luzia, pelo apoio nos momentos mais importantes da minha vida, pela paciência e o trabalho duro por me manter longe de casa. Muito obrigado;

À minha avó Helena, responsável por me ajudar a espairecer a mente durante os fins de semana;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques pela orientação, confiança e amizade no trabalho;

Ao Rodolfo D. Piazza pela grande amizade e supervisão científica durante a realização deste trabalho;

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

Aos amigos de turma pelos momentos inesquecíveis;

Aos amigos das repúblicas Atecubanos, Bátima Ki e Xurupitas, pelas diversas discussões;

À FAPESP pela bolsa concedida;

## RESUMO

Diversos fármacos apresentam baixa solubilidade dentro do corpo humano, diminuindo sua biodisponibilidade. Atualmente, diversas plataformas de liberação vêm sendo estudadas a fim de superar tal limitação. Entre os carreadores empregados, os copolímeros em bloco funcionalizados apresentam a vantagem de interagirem com o fármaco tanto hidrofílica quanto hidrofobicamente. Dessa forma, o estudo destas plataformas é fundamental para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos, permitindo um maior tempo de circulação no organismo. A eficiência de incorporação e liberação controlada é dependente do tamanho, morfologia e das interações dos blocos de copolímeros. O estudo se concentrou nas propriedades físico-químicas destes materiais (estabilidade coloidal e tamanho das micelas, tamanho de cadeia polimérica e afinidade micela-fármaco) com a finalidade de obter melhores resultados de incorporação. O uso destes carreadores é promissor no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. A diminuição dos efeitos colaterais, em função do uso destes carreadores, permitirá ao paciente um tratamento menos agressivo e mais eficiente, melhorando a qualidade de vida. Neste trabalho, avaliou-se a formação de micelas de copolímeros dibloco PEG-co-PCL com e sem funcionalização com ácido fólico com variado tamanho de cadeia e avaliou-se a eficiência de incorporação de metotrexato. O método sintético, no qual foram adicionados os monômeros na presença de catalisador em atmosfera inerte a um balão de fundo redondo, permitiu a obtenção de amostras com baixo índice de polidispersão. As amostras foram caracterizadas por diversas técnicas, tais como: espectroscopia de transmitância na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton, cromatografia de permeação em gel, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X. A estabilidade micelar determinada a partir da influência do pH e da temperatura no potencial zeta e no diâmetro hidrodinâmico das micelas, no qual estas não sofreram influência da temperatura e agregaram em valores de pH próximo a quatro. De maneira geral, a eficiência de incorporação de metotrexato foi elevada para as amostras de mPEG-co-PCL.

**Palavras-chave:** Copolímeros PEG-PCL. Micelas. Liberação de fármaco.

## ABSTRACT

Several drugs have low solubility within the human body, decreasing its bioavailability. Currently, several liberation platforms have been studied in order to overcome this limitation. Among the carriers employed, functionalized block copolymers have the advantage of interacting with the drug both hydrophilic and hydrophobically. Thus, the study of these platforms is fundamental for the encapsulation of hydrophobic drugs, allowing a greater time of circulation in the organism. The efficiency of incorporation and controlled release is dependent on the size, morphology and interactions of the copolymer blocks. The study focused on the physico-chemical properties of these materials (colloidal stability and micelle size, polymer chain length and micelle-drug affinity) in order to obtain better incorporation results. The use of these carriers is promising in the development of drug delivery systems. The reduction of the side effects, due to the use of these carriers, will allow the patient a less aggressive and more efficient treatment, improving the quality of life. In this work, the formation of micelles of PEG-co-PCL diblock copolymers with and without folic acid functionalization with varying chain size was evaluated and the efficiency of methotrexate incorporation was evaluated. The synthetic method, in which the monomers were added in the presence of catalyst in an inert atmosphere to a round bottom flask, allowed obtaining samples with low polydispersity index. The samples were characterized by several techniques, such as: infrared transmittance spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, gel permeation chromatography, thermogravimetry, differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. The micellar stability determined from the influence of the pH and temperature on the zeta potential and the hydrodynamic diameter of the micelles, in which the micelles were not influenced by temperature and added at pH values close to 4. In general, the incorporation efficiency of Methotrexate was high for the mPEG-co-PCL samples.

**Keywords:** PEG-PCL copolymer. Micelles. Drug delivery.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Resumo esquemático das vias pelas quais as micelas poliméricas podem interagir com a mucosa intestinal. (A) endocitose mediada por receptores; (B) pinocitose; (C) efluxo das moléculas de fármaco.	17
Figura 2 -	Esquema da formação de micelas poliméricas.	18
Figura 3 -	Esquema da formação de micelas poliméricas funcionalizadas com ácido fólico e a incorporação de metotrexato.	20
Figura 4 -	Reação de formação do copolímero PEG-co-PCL.	23
Figura 5 -	Espectro de transmitância na região do infravermelho das amostras sintetizadas. As amostras <b>(a)</b> , <b>(b)</b> e <b>(c)</b> foram sintetizadas a 120°C por 3 horas, as amostras <b>(d)</b> , <b>(e)</b> e <b>(f)</b> a 120° C por 24 horas e as amostras <b>(g)</b> , <b>(h)</b> e <b>(i)</b> a 180° C por 3 horas.	29
Figura 6. a -	Espectro de ressonância magnética nuclear de próton das amostras de mPEG-co-PCL. As amostras <b>1</b> , <b>2</b> e <b>3</b> foram sintetizadas a 120°C por 3 horas, as amostras <b>4</b> , <b>5</b> e <b>6</b> a 120° C por 24 horas e as amostras <b>7</b> , <b>8</b> e <b>9</b> a 180° C por 3 horas.	30
Figura 6. b -	Espectro de ressonância magnética nuclear de próton da amostra 1:3 mPEG-co-PCL a 120° C por 3 horas com as respectivas atribuições aos picos observados e expansão dos picos de integração.	31
Figura 7 -	Curva termogravimétrica das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL sintetizadas a 120°C durante 3 horas e a expansão da região de interesse com o início da degradação do material.	33
Figura 8 -	Curva de Calorimetria Diferencial de Varredura do copolímero mPEG-co-PCL nas composições 1:1, 1:3 e 1:5.	35
Figura 9 -	Difratograma das amostras 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.	37
Figura 10 -	Determinação da Concentração Micelar Crítica a partir da Tensão Interfacial água-ar em função do aumento da concentração do copolímero em solução.	38
Figura 11 -	Variação do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) em função do pH das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.	40

Figura 12 -	Diâmetro hidrodinâmico em função da variação dos valores de pH das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.	41
Figura 13 -	Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.	42
Figura 14 -	Espectro de absorvância do fármaco metotrexato na região do ultravioleta e visível.	43
Figura 15 -	Curva de calibração do fármaco metotrexato.	44
Figura 16 -	Espectro de transmitância na região do infravermelho das amostras do copolímero PEGMA-co-PCL-Acri-AF obtido a cada etapa sintética e os reagentes precursores ao produto final, referente ao copolímero funcionalizado com ácido fólico.	46
Figura 17 -	Região espectral no qual há o aparecimento das bandas dos grupos funcionais carbonila (éster), amida (não e monossubstituída) e imida nas cores cinza, verde e amarelo, respectivamente, aplicados à amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF.	48
Figura 18 -	Espectro de ressonância magnética nuclear de próton das amostras (1) PEGMA-co-PCL-Acri-AF e (2) PEGMA-co-PCL 1:1 e as respectivas atribuições dos picos observados.	49
Figura 19 -	Determinação da Concentração Micelar Crítica a partir da Tensão Interfacial água-ar em função do aumento da concentração dos copolímeros mPEG-co-PCL 1:1 e PEGMA-co-PCL-Acri-AF.	51
Figura 20 -	Variação do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) em função do pH das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.	53
Figura 21 -	Diâmetro hidrodinâmico em função da variação dos valores de pH das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.	54
Figura 22 -	Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.	55



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação biofarmacêutica de fármacos com base na sua aplicação.	13
Tabela 2 -	Condições experimentais em que foram realizadas as sínteses das amostras de mPEG-co-PCL.	23
Tabela 3 -	Comparação entre a massa molecular das amostras sintetizadas obtidas por RMN e por GPC.	32
Tabela 4 -	Dados obtidos sobre a massa molecular das amostras obtida por GPC.	32
Tabela 5 -	Diâmetro hidrodinâmico obtido das amostras de composição variada na condição de síntese de 120 °C durante 3 horas.	39
Tabela 6 -	Influência da variação de composição do copolímero na eficiência de incorporação do fármaco metotrexato.	45
Tabela 7 -	Massas moleculares dos copolímeros mPEG-co-PCL e PEGMA-co-PCL-Acri-AF obtidas por cromatografia de exclusão por tamanho.	50
Tabela 8 -	Diâmetro hidrodinâmico obtido das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\epsilon$ -CL	$\epsilon$ -Caprolactona
Acri	Acrilamida (propenamida)
AF	Ácido Fólico
DHFR	Di-Hidrofolato Redutase
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
MTX	Metotrexato
mPEG	Poli(etilenoglicol) metil éter
PdI	Índice de Polidispersão
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEGMA	Poli(etilenoglicol) metacrilato
PEG-co-PCL	Poli(etilenoglicol)- <i>copolímero</i> -poli(caprolactona)
PEGMA-co-PCL-Acri-AF	Poli(etilenoglicol)- <i>copolímero</i> -poli(caprolactona) polimerizado com acrilamida e funcionalizado com Ácido Fólico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
Sn(Oct) <sub>2</sub>	2-etilhexanoato de estanho II (popular Octanoato de estanho)
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\zeta$	Potencial Zeta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$D_h$	Diâmetro hidrodinâmico
Da	Dalton (equivalente a $1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
kDa	Quilo Dalton (equivalente a $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
g	Gramas
h	Horas
$\mu\text{m}$	Micrometro
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1. REAGENTES UTILIZADOS .....	22
3.2. SÍNTESE DO DIBLOCO PEG-co-PCL .....	22
3.3. FUNCIONALIZAÇÃO DO DIBLOCO PEG-co-PCL COM ÁCIDO FÓLICO .....	23
3.4. INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO METOTREXATO .....	24
3.5. CARACTERIZAÇÕES .....	25
3.5.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X .....	25
3.5.2. ESPECTROSCOPIA DE TRANSMITÂNCIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO .....	25
3.5.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>1</sup> H .....	25
3.5.4. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO .....	25
3.5.5. POTENCIAL ZETA .....	26
3.5.6. TENSÃO INTERFACIAL .....	26
3.5.7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORBÂNCIA NA REGIÃO DO UV-VIS .....	26
3.5.8. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO .....	27
3.5.9. ANÁLISE TÉRMICA .....	27
3.5.9.1. TERMOGRAVIMETRIA .....	27
3.5.9.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
4.1. COPOLÍMERO mPEG-co-PCL .....	28
4.2. COPOLÍMERO PEGMA-co-PCL FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO FÓLICO .....	46
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6. PROPOSTAS FUTURAS</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novas moléculas com atividade biológica é crescente nas últimas décadas. No entanto, a maioria destas moléculas apresenta baixa solubilidade em ambientes hidrofílicos como o corpo humano, inviabilizando seu uso como fármacos (1). A velocidade e a extensão da absorção do fármaco dependem, principalmente, de sua dissolução e permeabilidade no tecido em questão (2). Isso permite prever o tipo de administração do fármaco (liberação imediata ou à longo prazo) com base na classificação biofarmacêutica destas moléculas apresentada na

### Tabela 1:

**Tabela 1** – Classificação biofarmacêutica de fármacos com base na sua aplicação.

<b>Classe I</b>	<b>Classe II</b>
Elevada solubilidade	Baixa solubilidade
Elevada permeabilidade	Elevada permeabilidade
<b>Classe III</b>	<b>Classe IV</b>
Elevada solubilidade	Baixa solubilidade
Baixa permeabilidade	Baixa permeabilidade

**Fonte:** Adaptado de Manadas, R., et al (2).

Segundo LU, Y.; PARK, K. (1), estima-se que 70% das moléculas recém-descobertas sejam pouco solúveis em água e, muitas vezes, mesmo em solvente orgânico. A baixa solubilidade altera a biodisponibilidade da molécula de interesse no organismo, o que pode causar uma absorção desfavorável, reduzindo a eficiência do tratamento. Muitas vezes a baixa biodisponibilidade é tratada com o aumento da concentração da molécula bioativa no sangue, ocasionando o surgimento de efeitos colaterais nos pacientes e dificultando a formulação de remédios com alta eficiência de encapsulação, aumentando o custo da produção (1,3). Uma estratégia para contornar estas dificuldades geradas pela baixa solubilidade é desenvolver plataformas de liberação controlada que atuem como carreadores destes fármacos para sítios específicos do organismo (4).

O uso de plataformas de liberação apresenta mais vantagens do que o uso de

soluções contendo fármaco (3). Quando é empregado carreador, a biodistribuição da molécula ativa não depende mais de suas propriedades físico químicas, mas sim das propriedades de superfície do carreador. Assim, a superfície do carreador pode ser modificada para: **i)** ajustar suas propriedades físico químicas, **ii)** proteger a molécula ativa contra degradação enzimática e **iii)** direcionar o carreador para regiões específicas na qual a ação terapêutica é desejada (3). Os carreadores podem ser obtidos a partir de matrizes inorgânicas, orgânicas ou materiais híbridos, e ainda apresentarem ampla variedade de morfologia e tamanho (4). Sistemas de liberação controlada de moléculas bioativas possuem uma série de vantagem quando o dispositivo é preparado em nanoescala: **(i)** estes sistemas conseguem passar por vasos capilares devido ao baixo volume, além de minimizarem a ação de macrófagos do sistema de defesa, aumentando o tempo de permanência na corrente sanguínea; **(ii)** conseguem penetrar em células e tecidos até chegar no alvo desejado, **(iii)** aumentam a eficácia do tratamento e **(iv)** reduzem efeitos colaterais nos pacientes (5,6).

A utilização de sistemas poliméricos na liberação de fármacos hidrofóbicos no corpo humano tem sido alvo de estudos nas últimas décadas devido a sua eficiência terapêutica em atingir locais específicos (7). A estrutura responsável pelo transporte do fármaco precisa ser biocompatível e biodegradável para que seja possível reduzir efeitos colaterais dos fármacos, uma vez que a concentração empregada é diminuída (6,8).

Uma das estruturas mais citadas em trabalhos recentes são polímeros unidos em blocos (6–8). Estes compreendem duas ou mais subunidades de homopolímeros conectados por ligações covalentes, sendo que os diblocos e os triblocos são exemplos de copolímeros em blocos constituídos de dois ou três homopolímeros, respectivamente (8). As vantagens da união em blocos de polímeros estão no ganho de propriedades distintas como, por exemplo, a característica de interagir com moléculas polares e apolares (7,8).

Dentre os sistemas estudados encontram-se o polímero dibloco constituído por dois poliésteres, a poli(caprolactona) (PCL) e o poli(etilenoglicol) (PEG) (7,9–13). A PCL é um polímero semicristalino que apresenta propriedades físicas, térmicas e mecânicas variadas em função de sua massa molecular apresentando uma faixa de 530 a 630000 g.mol<sup>-1</sup> (14). Segundo LABET, M. et al. é pouco solúvel em água e

álcoois, porém é altamente solúvel em clorofórmio, tolueno, dioxano entre outros (14). É biocompatível e biodegradável. Seu tempo de degradação depende de sua massa molecular, grau de cristalinidade e o meio em que se encontra. Inicialmente, a fase amorfa é degradada, resultando em um aparente aumento da cristalinidade enquanto a massa molecular permanece constante. Em seguida, a clivagem de ligações éster resulta em perda de massa. Em temperaturas elevadas, ocorre a cisão no final da cadeia enquanto que em baixas temperaturas ocorre a cisão de cadeias aleatórias. A degradação é catalisada pelos ácidos carboxílicos liberados durante a hidrólise, mas também pode ser catalisado por enzimas, resultando numa degradação mais rápida. No entanto, no corpo humano a degradação da PCL não ocorre por meio de enzimas, permitindo o uso deste material como sistemas de liberação controlada (14).

Ainda de acordo com LABET, M., et al, existem dois métodos de preparar este composto: a condensação de ácido 6-hidróxiexanóico e a polimerização de abertura de anel da  $\epsilon$ -caprolactona (14), sendo este último baseado em quatro principais mecanismos: **i)** a polimerização aniônica baseada na formação de espécies aniônicas que atacam o carbono da carbonila presente no monômero, porém com significativa transesterificação intramolecular que resulta em polímeros de baixo peso molecular ou cíclicos; **ii)** a polimerização catiônica envolve a formação de espécies catiônicas que são atacadas pelo oxigênio da carbonila através de uma substituição nucleofílica; **iii)** a polimerização ativada por monômero ocorre a ativação de um monômero por um catalisador que é atacado pelo monômero ativado do final da cadeia polimérica e **iv)** a polimerização por coordenação-inserção onde a propagação da reação se dá pela coordenação do monômero com o catalisador e sua inserção em uma ligação carbono-oxigênio do catalisador, que durante a propagação culmina no crescimento da cadeia ligada ao metal através de ligação alcóxido. A polimerização coordenação-inserção é a mais comum e utilizada, com o uso de um catalisador que apresenta um metal (estanho – 2-etilhexanoato de estanho II, abreviado como octanoato de estanho) em sua composição. A escolha desse catalisador baseou-se em sua eficiência, disponibilidade comercial, facilidade na manutenção e principalmente, sua solubilidade nos solventes utilizados. A obtenção do PCL pode ser feita a partir da copolimerização com o PEG atuando como macroiniciador (6,12).

Assim como a PCL, o PEG também é biocompatível e biodegradável, que

favorece sua escolha para a síntese do projeto (12). Apresenta alta solubilidade em solventes polares (água e álcoois), sendo responsável pela camada exterior hidrofílica da micela que, conseqüentemente, estará em contato com água simulando um comportamento similar no corpo humano. Além de biocompatível, PEG é não citotóxico e não imunogênico, aumentando seu tempo de circulação na corrente sanguínea evitando a adsorção de proteína e biomoléculas (12).

O copolímero PEG-PCL em meio aquoso, devido suas características anfifílicas, apresenta repulsão da parte hidrofóbica da cadeia que começam a se posicionar na superfície da solução, enquanto a parte hidrofílica interage com o solvente (11). Uma vez que a concentração atingir um limite (concentração micelar crítica) inicia-se a formação de micelas nanoestruturadas com núcleos apolares (PCL) e extremidades polares (PEG) (6). O comprimento do segmento hidrofóbico correlaciona-se diretamente com a estabilidade (15). Quando o segmento hidrofílico é mais curto que o núcleo do bloco, o formato das micelas resultantes tende a ser esférico (11). O aumento de massa molecular do segmento hidrofóbico facilita a formação da micela devido a maior parte da massa do copolímero estar no centro da micela. Fatores como a composição do copolímero, o tamanho das cadeias dos polímeros e agentes de segmentação influenciam diretamente na formação da micela (6,11,15).

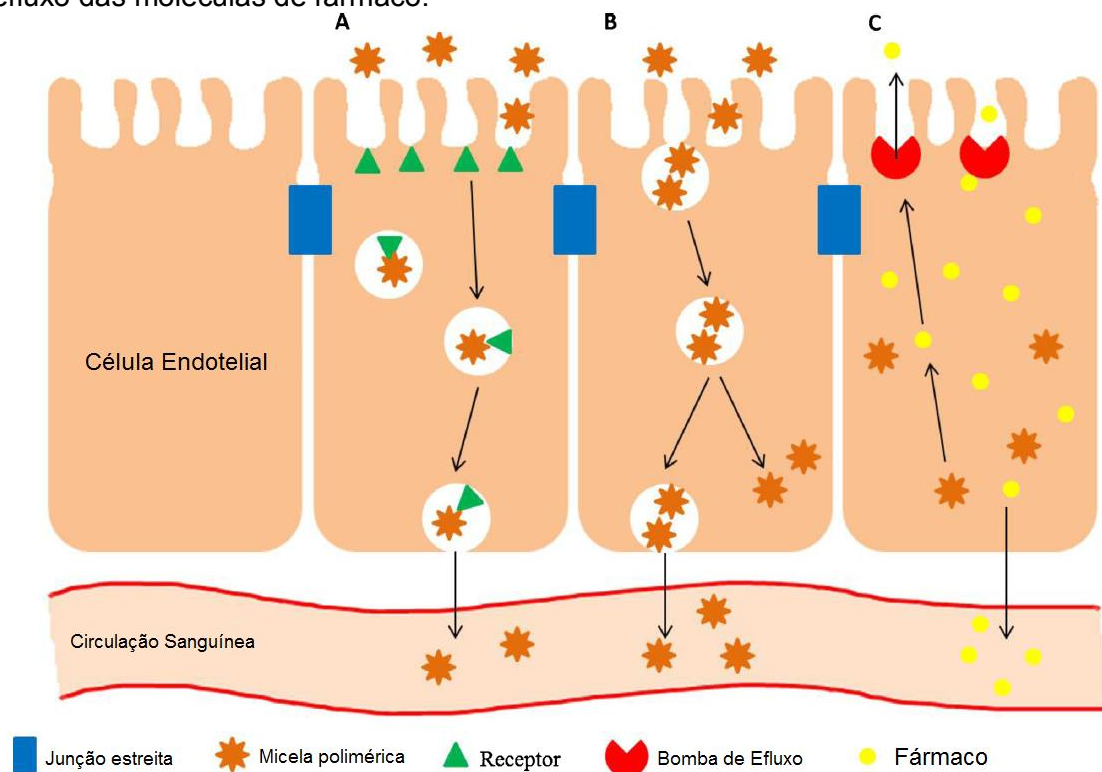
Existem diversas rotas de administração de fármacos no corpo humano (16). Do ponto de vista do paciente e indústria farmacêutica, a administração de fármacos via oral é o método preferencial (1). Em relação aos pacientes, a administração do fármaco é fácil e indolor, podendo ser automedicada em casos crônicos. Entretanto, a formulação de remédios para uso oral é um processo complexo, principalmente pela baixa solubilidade em água dos principais fármacos, ocasionando baixa dissolução e conseqüentemente, biodisponibilidade e eficiência reduzidas. A eficiência de fármacos no corpo humano pode ser reduzida devido às barreiras fisiológicas do trato gastrointestinal, que podem ser ultrapassadas com o auxílio de sistemas de encapsulamento de fármaco, tais como micelas. Porém, é importante caracterizar o sistema de liberação específico utilizado já que a absorção pelo tecido gastrointestinal é altamente dependente do tamanho da partícula, forma, carga e hidrofobicidade (17).

A absorção intestinal de micelas ocorre através da incorporação intercelular no epitélio intestinal e no tecido linfático (17). Existem três rotas principais pelas



quais pode ocorrer a absorção de sistemas micelares pela membrana celular. **(i)** Na ausência de grupos específicos na superfície, as micelas podem ser absorvidas intactas por enterócitos desencadeado por interações não específicas (ligações de hidrogênio ou interações de van der Waals) entre a superfície da micela e a célula. **(ii)** A absorção pode ocorrer por pinocitose, onde a superfície da célula forma invaginações que englobam as micelas. **(iii)** A funcionalização de superfície das micelas com grupos funcionais específicos pode promover a absorção mediada por receptores localizados na superfície das células. A **figura 1** representa as rotas principais de absorção de sistemas micelares pela membrana celular.

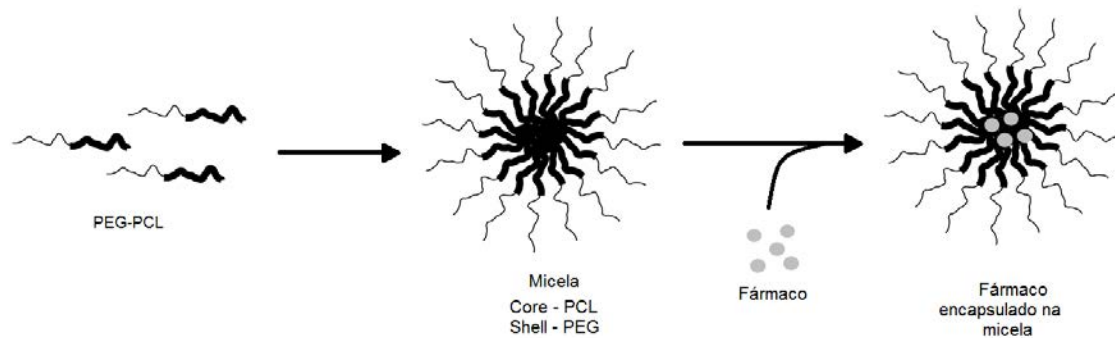
**Figura 1** – Resumo esquemático das vias pelas quais as micelas poliméricas podem interagir com a mucosa intestinal. (A) endocitose mediada por receptores; (B) pinocitose; (C) efluxo das moléculas de fármaco.



Fonte: Adaptado de LU, Y; PARK, L (1).

A **figura 2** representa a formação de uma micela em solução aquosa seguida da encapsulação de uma substância.

**Figura 2** – Esquema da formação de micelas poliméricas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para a liberação controlada do fármaco, existem dois métodos distintos: o método passivo e o ativo. No método passivo, após o tumor atingir um determinado tamanho, os vasos sanguíneos que o circundam não são suficientes para fornecer oxigênio para sua proliferação. Como as células começam a morrer, elas secretam fatores de crescimento que provocam o surgimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos capilares circundantes (18). Este processo, conhecido como angiogênese, promove o rápido desenvolvimento de vasos sanguíneos irregulares que apresentam um epitélio descontínuo e carecem da membrana basal das estruturas vasculares normais. Com a formação destes capilares, há a formação de fenestrações. Estas fenestrações culminam na permeação de carreadores no interior do tumor e o sistema linfático defeituoso nesta região minimiza a drenagem contínua, a renovação do líquido intersticial e a reciclagem de solutos e coloides de volta para a circulação. Esse ambiente permite a entrada do carreador contendo o fármaco, a liberação controlada no interior da célula cancerígena e a permanência do fármaco na célula para efeitos terapêuticos. Enquanto que no método ativo, envolve a utilização de ligantes específicos na superfície do carreador que apresentam afinidade pelas células alvo doentes permitindo sua absorção (18). Para beneficiar essa afinidade, o carreador cuja superfície foi funcionalizada com ligantes, é preciso que tanto a célula alvo quanto o carreador estejam próximos. Os ligantes utilizados para reconhecimento pode ser anticorpos, proteínas, açúcares, ácidos nucleicos e vitaminas. Dentre as vitaminas, o ácido fólico participa na síntese, na reparação e na metilação do DNA. Como na região do tumor há multiplicação desordenada de células, o consumo/a necessidade de ácido fólico aumenta para suprir a síntese de novas células. Dessa forma, carreadores funcionalizados com

ácido fólico permitem melhor absorção destes pelas células alvo com maior facilidade (18).

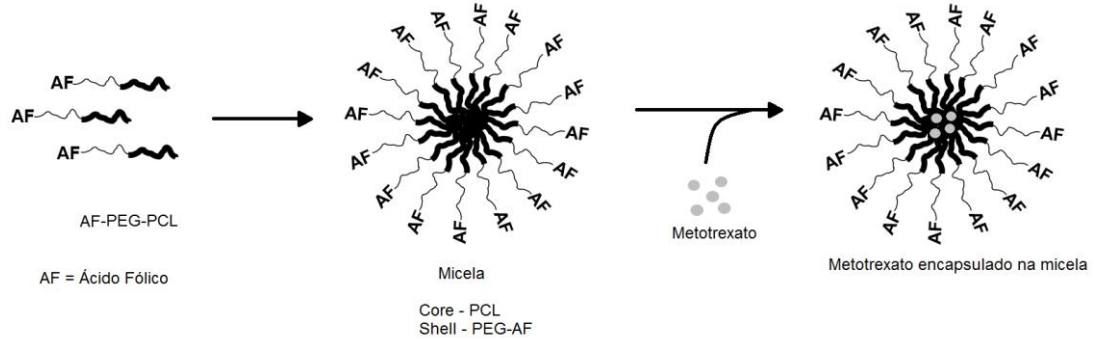
Desta forma, desenvolver uma micela de copolímeros PEG-PCL e modificá-la com ácido fólico permitirá o desenvolvimento de um material com potencial para aplicação em liberação controlada de fármacos hidrofóbicos em tecidos cancerígenos. Basicamente a estratégia será sintetizar o bloco de copolímero PEG-PCL e após efetuar a modificação do segmento terminal do PEG para que seja obtida uma micela hidrofóbica no interior (PCL) e hidrofílica por fora (PEG) com a vantagem de possuir moléculas de ácido fólico na superfície junto com o PEG aumentando o tempo de circulação na corrente sanguínea e direcionando especificamente para tecidos cancerígenos, dado a presença de ácido fólico.

Para avaliar os dispositivos será estudado o perfil de liberação do metotrexato (MTX). Metotrexato é um fármaco análogo ao ácido fólico, antimetabolito e antifolato utilizado no tratamento de câncer e doenças auto imune (19–21). Metotrexato age por inibição do metabolismo do ácido fólico. Metotrexato competitivamente e irreversivelmente inibe a ação da di-hidrofolato redutase (DHFR), uma enzima que participa na síntese de tetrahidrofolato (21). A afinidade do metotrexato com a DHFR é cerca de mil vezes maior do que a do ácido fólico com DHFR. Di-hidrofolato redutase catalisa a conversão de di-hidrofolato em tetrahidrofolato ativo. O ácido fólico é necessário para a síntese de timidina, necessária para a síntese de DNA. Além disso, folato é necessária para a síntese de base purina. Metotrexato, portanto, inibe a síntese de DNA e RNA. Por conseguinte, o metotrexato interfere no crescimento de células do corpo, especialmente células que se reproduzem rapidamente, tais como células cancerosas, células de medula óssea, pele, entre outras (22). Metotrexato é amplamente utilizado no tratamento de doenças malignas, incluindo leucemia linfocítica aguda na infância, osteossarcoma, linfomas, câncer de cabeça e pescoço, câncer do pulmão, câncer de mama, psoríase, câncer, entre outros.

No entanto, as doses elevadas de metotrexato frequentemente utilizados em quimioterapia de câncer podem causar efeitos colaterais tóxicos para as células com divisão celular rápida, tais como células da medula óssea, células de cabelo, e células da mucosa gastrointestinal. Portanto, a utilização de um dispositivo de liberação controlada de fármacos reduzirá os efeitos colaterais e permitirá a aplicação de MTX em tratamento de cânceres. A **figura 3** representa o esquema do

sistema micelar que se pretende obter neste trabalho:

**Figura 3** – Esquema da formação de micelas poliméricas funcionalizadas com ácido fólico e a incorporação de metotrexato.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 2. OBJETIVOS

Caracterizar a formação de micelas de copolímeros dibloco PEG-co-PCL variando tamanho de cadeia e verificando a eficiência de incorporação e liberação de fármaco metotrexato.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar copolímero dibloco poli(etilenoglicol)-co-poli(caprolactona) (PEG-co-PCL), variando o tamanho de cadeia polimérica em função do tempo e temperatura da reação de copolimerização.

- Estudar a morfologia dos copolímeros em bloco em função da razão PEG:PCL

- Avaliar a estabilidade coloidal dos copolímeros em bloco em meio aquoso.

- Estudar a incorporação e o perfil de liberação de metotrexato em meio aquoso.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES UTILIZADOS

Todos os reagentes utilizados na síntese e caracterização das amostras apresentam pureza analítica e não foi necessário nenhum processo prévio de purificação dos mesmos. Os polímeros e monômeros utilizados foram: Poli(etilenoglicol)metil éter 550 kDa (Sigma Aldrich),  $\epsilon$ -Caprolactona (Sigma Aldrich) e Poli(etilenoglicol)metacrilato 550 Da (Sigma Aldrich). Os catalisadores utilizados, tanto na síntese do copolímero mPEG-co-PCL quanto PEGMA-co-PCL funcionalizado com ácido fólico, tais como: 2-etilhexanoato de estanho II [Sn(Oct)<sub>2</sub>] e persulfato de potássio foram obtidos da Sigma Aldrich. O fármaco metotrexato e o ácido fólico utilizados em conjunto com o copolímero também foram adquiridos da Sigma Aldrich. Para as sínteses que necessitaram de uma atmosfera livre de oxigênio e inerte foi utilizado gás argônio (Ar) comercial.

#### 3.2. SÍNTESE DO DIBLOCO PEG-co-PCL

A síntese dos copolímeros PEG-co-PCL seguiu o método da polimerização por inserção-coordenação. Realizou-se a síntese através da abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona na presença de mPEG-OH como macroiniciador da polimerização e 2-etilhexanoato de estanho II - Sn(Oct)<sub>2</sub> - como catalisador (23). Inicialmente, 1,000g de PEG (utilizado como padrão para as diferentes composições) foi adicionado ao balão de três bocas, junto de 1,000 g de PCL e 0,34 mL de Sn(Oct)<sub>2</sub>, sendo esta a primeira composição testada a fim de avaliar o comportamento da síntese e a consistência do produto obtido. O volume do catalisador utilizado permaneceu constante em todas as sínteses. A fim de garantir uma atmosfera livre de oxigênio, foi borbulhado gás argônio na solução e posteriormente, a realização de vácuo. Esse procedimento foi repetido três vezes, no qual o sistema permaneceu em vácuo durante toda a síntese. A fim de se avaliar qual das variáveis (tempo, temperatura e composição) apresentava maior influência sobre a massa molecular do copolímero formado, foram realizadas nove sínteses diferentes mantendo duas das três variáveis constantes durante todo o processo:

A **tabela 2** representa as condições de sínteses utilizadas:

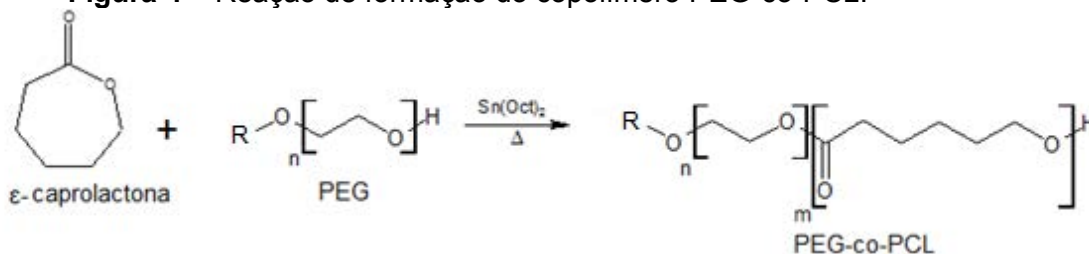
**Tabela 2** – Condições experimentais em que foram realizadas as sínteses das amostras de mPEG-co-PCL.

Composições (m/m) de mPEG-co-PCL	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1:1, 1:3 e 1:5	3	120
1:1, 1:3 e 1:5	24	120
1:1, 1:3 e 1:5	3	180

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **figura 4** representa o esquema da reação.

**Figura 4** – Reação de formação do copolímero PEG-co-PCL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a síntese, todas as amostras foram transferidas dos balões de 3 bocas para tubos Falcon, dissolvidas em (clorofórmio) e lavadas 3 vezes com hexano gelado a fim de ocorrer a precipitação do copolímero. As lavagens consistiram na adição de hexano gelado às amostras, homogeneização das mesmas em vórtex onde permaneciam sob agitação por 10 min, foram dispersas em banho ultrassônico por 10 min e novamente homogeneizadas em vórtex a fim de garantir a remoção dos reagentes não consumidos na síntese e por fim, as amostras foram centrifugadas a 8000 RPM por 15 min.

### 3.3. FUNCIONALIZAÇÃO DO DIBLOCO PEG-co-PCL COM ÁCIDO FÓLICO

Para a funcionalização, partiu-se do monômero PEGMA [Poli(etileno glicol) metacrilato] como macroiniciador, realizou-se a síntese com a  $\epsilon$ -caprolactona na presença do catalisador 2-etilhexanoato de estanho II -  $Sn(Oct)_2$ , similar à síntese e lavagem descrita no item acima. A condição de síntese utilizada foi 120° C durante 3 horas. O grupo vinílico, pertencente ao PEGMA, foi polimerizado ao grupo vinílico da

propenamida na presença do iniciador persulfato de amônio em meio aquoso sob agitação a 70° C em atmosfera inerte durante 6 horas. O persulfato de amônio, por conter uma ligação O–O (peróxi), é ativado a 70° C e rompe esta ligação, dando início a polimerização radicalar. O material obtido foi rotoevaporado, posteriormente suspenso e lavado com acetona. Após seco em estufa a 50° C durante 24 horas, o copolímero PEGMA-co-PCL-Acri foi adicionado a um erlenmeyer e solubilizado em DMSO. Foi adicionado ácido fólico na proporção molar 1:2 em relação ao copolímero ao erlenmeyer contendo o copolímero já solubilizado. A reação foi realizada em atmosfera inerte, a 70°C durante 24 horas. A reação que ocorreu entre o ácido fólico (ácido dicarboxílico) e a amida é uma condensação com a formação de uma imida (24). A cada etapa sintética houve a caracterização espectroscópica do material obtido.

### 3.4. INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO METOTREXATO

Para o estudo de incorporação de fármaco, foi obtida uma curva de calibração com concentrações de metotrexato variando 1 a 30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , utilizando um espectrofotômetro na região do visível para determinar absorção das amostras padrão. Foi adicionado a um tubo de ensaio 30 mg do copolímero sintetizado para determinação da eficiência de incorporação do fármaco. A dispersão foi mantida sob agitação de 500 RPM, a 25°C durante 24 horas. A absorção máxima do metotrexato ocorre no comprimento de onda de 303 nm, valor fixado para determinação da concentração do fármaco. Após este período, as micelas foram removidas por centrifugação e a quantidade de fármaco não incorporado foi determinada no sobrenadante.

$$\text{Eficiência de Incorporação \%} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

**Equação 1.**

sendo  $C_i$  – Concentração inicial e  $C_f$  – Concentração final.

A liberação foi monitorada utilizando o método da diálise, onde as micelas contendo o fármaco em seu interior foram adicionadas a uma membrana de diálise, que foi selada e submergida em um tampão fosfato (pH 7.4) para simular o pH fisiológico do corpo humano. A membrana de diálise permaneceu sob agitação



constante durante o período de estudo. Alíquotas de 0,750 mL foram retiradas da solução de hora em hora que foram substituídas por tampão fosfato, mantendo-se o volume constante. Para monitoramento, foram realizadas medidas no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 303 nm, para avaliar a liberação de metotrexato.

### 3.5. CARACTERIZAÇÕES

#### 3.5.1. Difração de raios X.

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Siemens, modelo D5000. O intervalo de varredura  $2\theta$  foi de  $5^\circ$  a  $40^\circ$ , com velocidade de varredura de  $0,02^\circ$  por segundo, empregando radiação  $\text{Cu}(K\alpha)$ .

#### 3.5.2. Espectroscopia de transmitância na região do Infravermelho.

Os espectros de transmitância na região do infravermelho foram obtidos com o espectrofotômetro PerkinElmer, modelo Frontier Dual Range. Não foi necessário nenhum tipo de preparação das amostras para a realização das medidas. Para coleta dos espectros foram realizadas 64 varreduras entre o intervalo 4000 a  $500\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos pela técnica de refletância total atenuada (ATR), sendo muito usada para a análise de polímeros.

#### 3.5.3. Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ .

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro Bruker Fourier 300 MHz. As amostras foram diluídas em  $\text{CCl}_3\text{D}$  (aproximadamente 10 mg). A linha de referência empregada na análise foi de 7,28 ppm referente à  $\text{CCl}_3\text{D}$ .

#### 3.5.4. Espalhamento de luz dinâmico

O diâmetro hidrodinâmico das amostras foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, marca Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico,

na qual o detector é posicionado em um ângulo de 173° em relação à luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25° C. A técnica permite determinar o tamanho das partículas através da equação de Stokes – Einstein (equação 1), na qual  $D_h$  corresponde ao diâmetro hidrodinâmico,  $D$  ao coeficiente de difusão translacional,  $k$  à constante de Boltzmann,  $T$  à temperatura e  $n$  à viscosidade. As amostras foram filtradas a vácuo através de filtro Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  a fim de remover aglomerados de micelas e manter a homogeneidade do sistema (25).

$$D_h = \frac{kT}{3\pi nD}$$

**Equação 2**

### 3.5.5. Potencial Zeta

O potencial Zeta ( $\zeta$ ) foi determinado, indiretamente, em um equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. As amostras foram dispersas em solução aquosa de NaCl 0,001 mol.L<sup>-1</sup>. As amostras foram tituladas no intervalo de pH de 2 a 10 e o potencial Zeta foi medido a cada 0,5 unidade de pH (25).

### 3.5.6. Tensão Interfacial

A tensão interfacial foi determinada em um equipamento Ângulo de Contato OCA 15. O método utilizado foi o da Gota Pendente, no qual a gota na eminência da queda é fotografada por meio da câmera acoplada ao equipamento. Posteriormente, o contorno da gota foi ajustado por uma curva, que através da equação de Young-Laplace, permite a obtenção do valor da tensão interfacial, nesse caso entre a solução água + polímero e o ar.

### 3.5.7. Espectroscopia de absorbância na região do UV-Visível

Foi utilizado o equipamento Lambda 465 da PerkinElmer para o estudo de incorporação e liberação de fármaco. Possui duas lâmpadas, uma de tungstênio que varre a região de 290 a 1100 nm e outra de deutério para a região 190 a 290 nm. Possui resolução óptica de 1 nm, permitindo satisfazer os requisitos de um número variado de farmacopeias (26,27). As amostras foram medidas à 37° C. As medidas

foram realizadas no comprimento de onda 303 nm, característico da absorção do metotrexato. A alíquota utilizada para determinação estava isenta de partículas de copolímero, removido através de centrifugação ou membrana de diálise.

### 3.5.8. Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Foi utilizado o equipamento Viscotek GPCmax da Malvern com detector Viscotek RI Detector (VE3580) baseado na diferença do índice de refração da fase móvel (Tetrahidrofurano – THF) e a substância de interesse. O fluxo de THF utilizado foi  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Foram utilizadas três colunas na separação da marca Shodex KF-806M N° C1440XXX (XXX = 098 e 100 e 101). Para a calibração das colunas, foram utilizados padrões de poliestireno. Os volumes das amostras injetadas foram de 100  $\mu\text{L}$  (28).

### 3.5.9. Análise Térmica (29,30)

#### 3.5.9.1. Termogravimetria (TG)

O equipamento para a realização do experimento foi Netzsch modelo STA 409C/CD com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  sob atmosfera oxidante e a faixa de temperatura foi de  $20^\circ$  a  $430^\circ \text{C}$ . Para a realização das medidas foram utilizadas aproximadamente 20 mg das amostras

#### 3.5.9.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

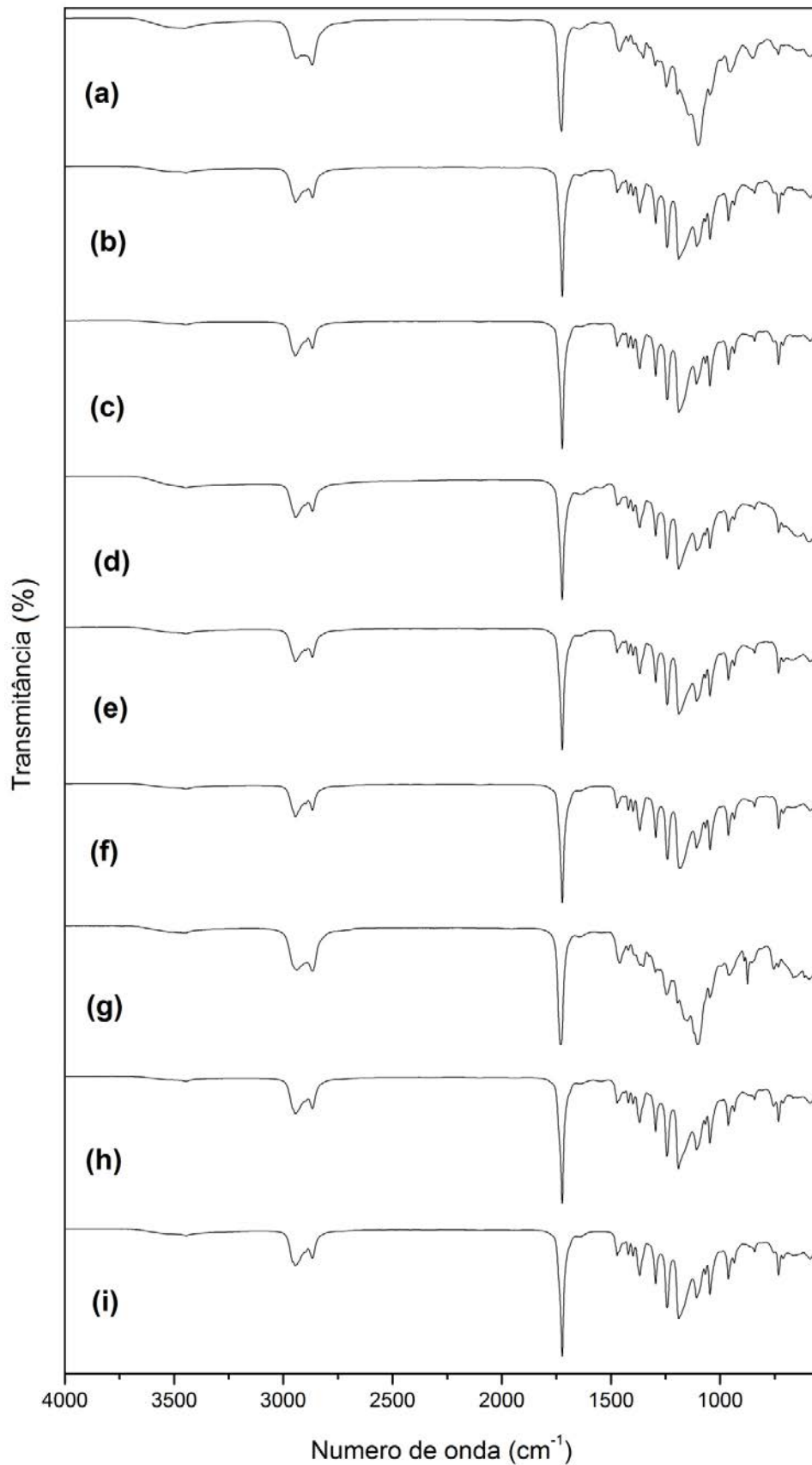
Foi utilizado um equipamento da TA Instruments, modelo DSC Q100, no qual as amostras foram analisadas entre  $-40^\circ$  e  $100^\circ\text{C}$ , com fluxo de Nitrogênio e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Para a realização das medidas foram utilizadas aproximadamente 30 mg das amostras.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. COPOLÍMERO mPEG-co-PCL

Existem duas principais metodologias para a síntese de polímeros partindo-se do monômero da  $\epsilon$ -caprolactona: a condensação de ácido 6-hidróxiexanóico e a polimerização de abertura de anel da  $\epsilon$ -caprolactona, sendo esta última baseada em quatro principais mecanismos (14). Existem quatro mecanismos principais para a polimerização de abertura de anel e eles dependem do tipo de catalisador, podendo ser: aniônico, catiônico, ativado pelo monômero e coordenação-inserção. Segundo LABET, M., et al (14), o mecanismo largamente utilizado é a polimerização de abertura de anel (ROP) através do mecanismo de coordenação-inserção por ser mais eficiente e simples. O copolímero foi obtido pela adição de poli(etileno glicol)metil éter (mPEG),  $\epsilon$ -caprolactona e 2-etilhexanoato de estanho II (abreviado como octanoato de estanho) a um balão de três bocas, onde permaneceu selado sob vácuo e temperatura constante durante o período de síntese. A **figura 5** apresenta o espectro de transmitância na região do infravermelho para as nove amostras sintetizadas, onde se variou a temperatura e o tempo de síntese, sendo três amostras sintetizadas a 120°C durante 3 horas, três amostras a 120°C durante 24 horas e três amostras a 180°C durante 3 horas. Foi possível observar que todas apresentaram os mesmos grupos funcionais principais. Nota-se que houve um pequeno deslocamento entre os grupos funcionais do copolímero entre as amostras, porém essa variação é em virtude da diferença do comprimento da cadeia polimérica das amostras. A banda fraca em 2945 e 2860  $\text{cm}^{-1}$  deve-se ao estiramento C–H dos grupos metilênicos ( $-\text{CH}_2-$ ) localizados na maior parte da cadeia polimérica. O estiramento da ligação C=O foi observado em 1720  $\text{cm}^{-1}$  que condiz com grupos carbonila referentes à ligação éster proveniente da cadeia de policaprolactona. Foi possível observar bandas do estiramento C–O em números de onda diferentes, em torno de 1100 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas que aparecem entre 700 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à estrutura do esqueleto da cadeia do copolímero (dobramento, oscilação e alongamento dos grupos metilênicos) e isomerização *gauche–trans* do grupo éster (7,9,10,31).

**Figura 5** – Espectro de transmitância na região do infravermelho das amostras sintetizadas. As amostras **(a)**, **(b)** e **(c)** foram sintetizadas a 120°C por 3 horas, as amostras **(d)**, **(e)** e **(f)** a 120° C por 24 horas e as amostras **(g)**, **(h)** e **(i)** a 180° C por 3 horas.

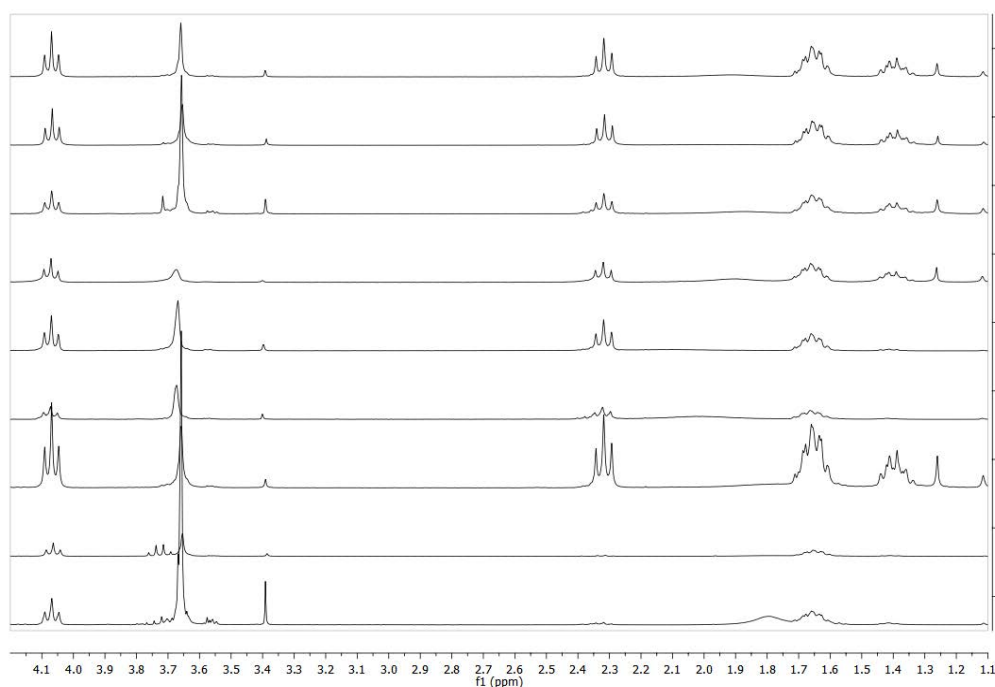


Fonte: Elaborado pelo autor

Através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton, foi possível obter informações da estrutura polimérica das amostras analisadas.

A **figura 6.a** apresenta o espectro de ressonância magnética nuclear de próton para as nove amostras sintetizadas no qual foi possível identificar grupos metilenos e metóxi pertencentes ao mPEG e grupos metilenos pertencentes ao PCL. Os picos referentes aos grupos metóxi e metileno do mPEG apresentam-se em 3.40 e 3.72 ppm, respectivamente. Quanto ao PCL, a presença de seus grupos metilenos são observados em 1.40, 1.65, 2.33 e 4.07 ppm, aproximadamente (7,9,10,13,31,32). Nos espectros 1 e 2, os picos em 1.40 e 2.33 ppm e nos espectros 4 e 5, o pico em 1.40 ppm, apresentaram baixa intensidade pois são referentes às amostras de menores composições (1:1 mPEG-co-PCL nos espectros 1 e 4 e 1:3 mPEG-co-PCL nos espectros 2 e 5) e temperatura (120° C por 3 horas nos espectros 1 e 2 e 120° C por 24 horas nos espectros 4 e 5), logo os polímeros formados apresentam menores massas moleculares em comparação com os demais devido a menor quantidade de monômeros de PCL incorporados ao polímero durante a síntese, portanto os sinais dos picos atribuídos aos grupos metilenos de PCL no espectro resultaram em baixa intensidade.

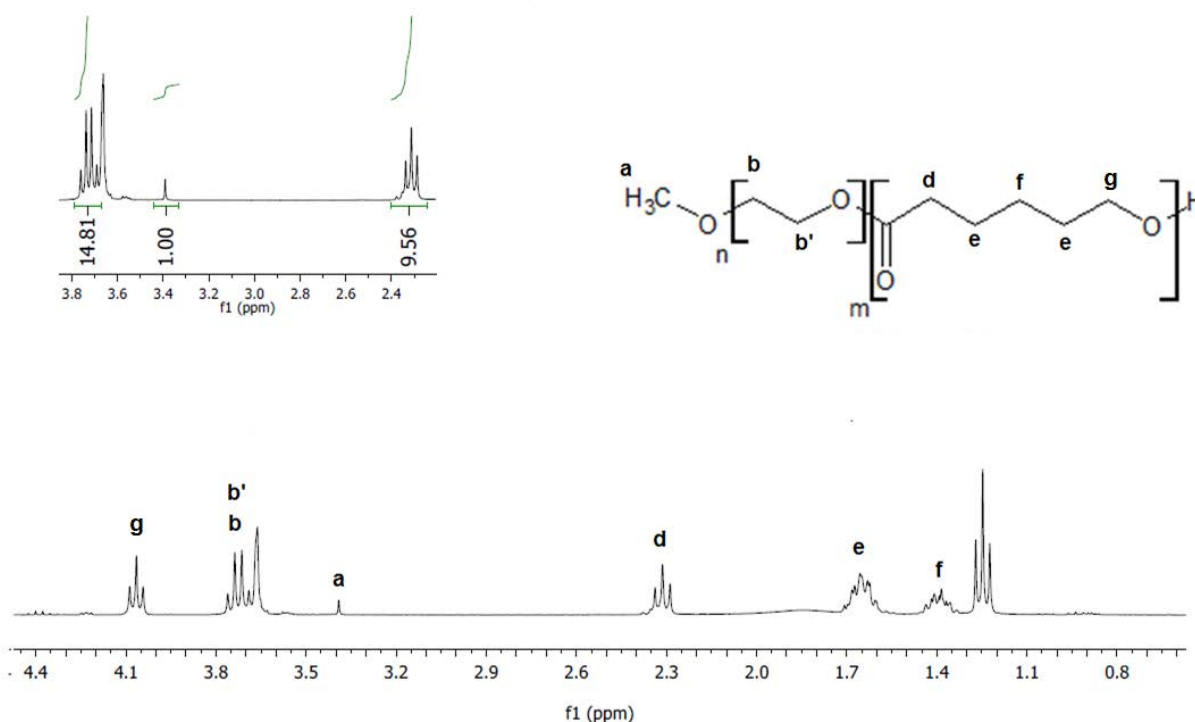
**Figura 6. a** – Espectro de ressonância magnética nuclear de próton das amostras de mPEG-co-PCL. As amostras **1, 2 e 3** foram sintetizadas a 120°C por 3 horas, as amostras **4, 5 e 6** a 120° C por 24 horas e as amostras **7, 8 e 9** a 180° C por 3 horas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor

A **figura 6. b** representa o esquema das atribuições dos picos do espectro de ressonância magnética nuclear de próton da amostra 1:3 mPEG-co-PCL a 120° C por 3 horas. A expansão presente mostra os valores de integração das áreas dos picos selecionados para a determinação da massa molecular aproximada do copolímero sintetizado.

**Figura 6. b** – Espectro de ressonância magnética nuclear de próton da amostra 1:3 mPEG-co-PCL a 120° C por 3 horas com as respectivas atribuições aos picos observados e expansão dos picos de integração.



**Fonte:** Elaborado pelo autor

Os sinais dos picos do mPEG (3.40 e 3.72 ppm) e do PCL (2.33 ppm) foram utilizados para determinar a massa molecular aproximada do polímero formado com base nos valores de integração da área dos mesmos (10,31). O sinal do metóxi (mPEG) foi utilizado como padrão pois este não apresentava repetições, sendo atribuído seu valor de integração igual a um. O valor de integração da área do pico em 3.72 ppm (mPEG) foi aproximadamente quinze, que ao multiplicar por três (número de prótons presente no metóxi) e dividir por quatro (número de prótons observados em ambos os metilenos do mPEG), resultou no valor aproximado de doze que representa o número de repetições do mPEG, que ao multiplicar esse valor pela massa molecular do monômero do mPEG ( $= 44 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e somar a massa do

grupo metóxi ( $= 31 \text{ g.mol}^{-1}$ ), correspondeu aproximadamente à massa molecular do mPEG ( $=550 \text{ g.mol}^{-1}$ ) informado no rótulo do reagente utilizado. Para determinar-se o número de repetições dos monômeros de PCL na amostra sintetizada, foi utilizado o sinal do pico em 2.33 ppm e realizado os mesmos cálculos explicados anteriormente. Dessa forma, foi possível calcular a massa molecular aproximada das nove amostras sintetizadas que foi comparado com os valores das massas moleculares obtidas no GPC. Tais resultados estão presentes nas **tabelas 3 e 4**:

**Tabela 3** – Comparação entre a massa molecular das amostras sintetizadas obtidas por RMN e por GPC.

Composição (m:m) mPEG-co-PCL	Condições	Massa molecular /g.mol <sup>-1</sup> (RMN <sup>1</sup> H)	Massa molecular /g.mol <sup>-1</sup> (GPC)
1:1	120° C por 3 horas	2033	2976
1:3		4085	6807
1:5		8189	12058
1:1	120° C por 24 horas	2888	2942
1:3		5111	8836
1:5		8873	12254
1:1	180° C por 3 horas	2717	4480
1:3		4769	8992
1:5		6479	12416

**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Tabela 4** – Dados obtidos sobre a massa molecular das amostras obtida por GPC.

Composição (m:m) mPEG-co-PCL	Condições	Mn /g.mol <sup>-1</sup>	Mw /g.mol <sup>-1</sup>	Mw/Mn
1:1	120° C por 3 horas	2976	3375	1,134
1:3		6807	7952	1,168
1:5		12058	14299	1,186
1:1	120° C por 24 horas	2942	3675	1,249
1:3		8836	10280	1,163
1:5		12254	14838	1,211
1:1	180° C por 3 horas	4480	4986	1,113
1:3		8992	10723	1,192
1:5		12416	14832	1,195

**Fonte:** Elaborado pelo autor

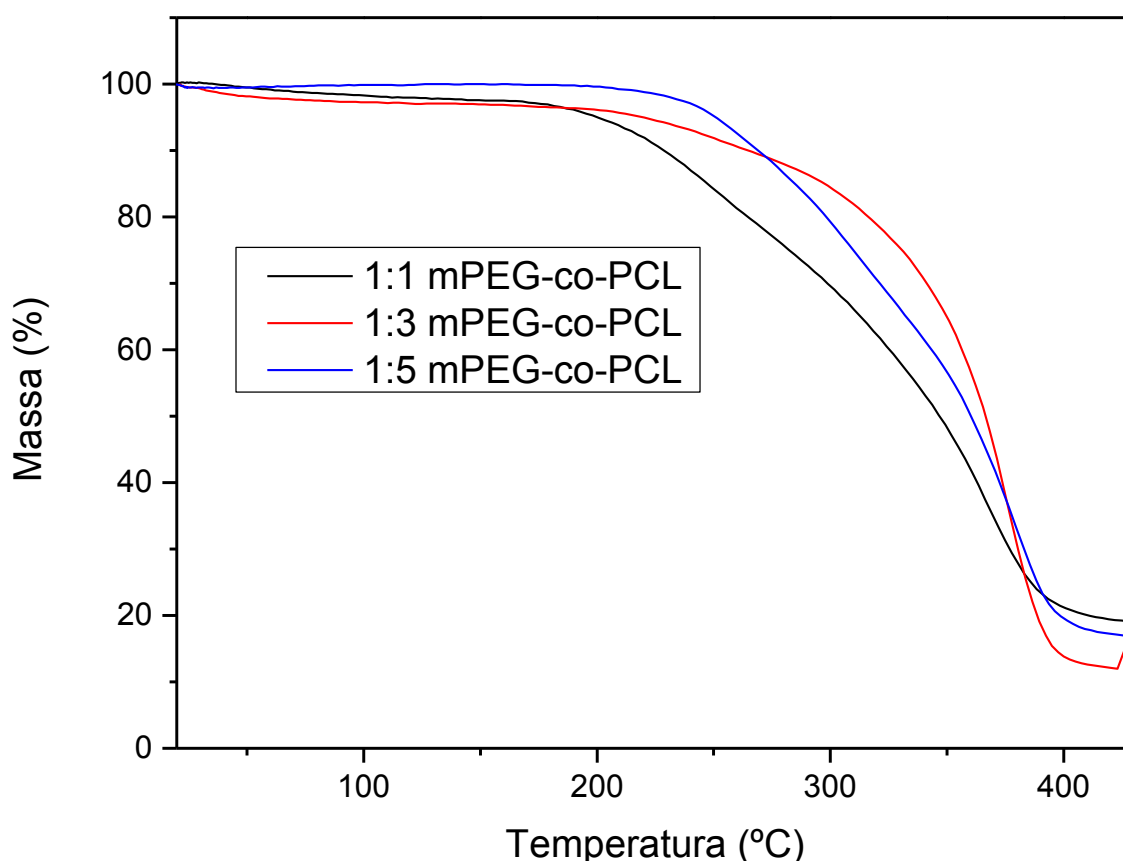


A partir dos valores de massa molecular obtidos a partir do GPC das nove amostras sintetizadas mostram que tanto a temperatura quanto o tempo de síntese não afetam significativamente o tamanho do copolímero formado já que as massas medidas são muito próximas para composições semelhantes apesar das diferentes condições.

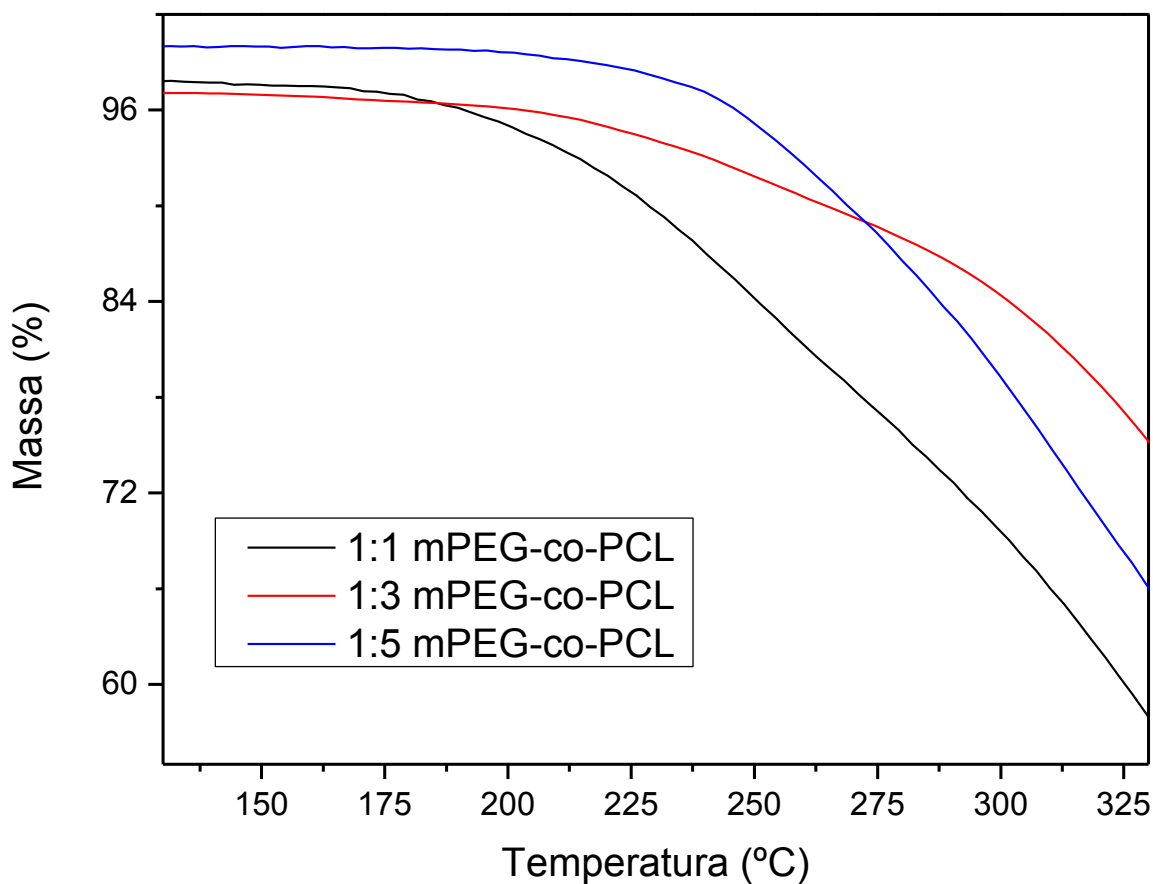
A variável composição foi responsável pelo acréscimo na massa molecular dos copolímeros formados, portanto foi escolhido o conjunto de amostras 1:1, 1:3 e 1:5 mPEG-co-PCL sintetizados a 120°C durante 3 horas para a realização dos estudos subsequentes.

Foi analisado o comportamento do copolímero das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 na condição de 120°C durante 3 horas entre 20° e 430° C a fim de se determinar outras possíveis temperaturas de síntese na avaliação das variáveis que influenciavam no tamanho dos copolímeros formados. A curva de degradação da amostra frente ao aumento da temperatura está representada na **figura 7**.

**Figura 7** – Curva termogravimétrica das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL sintetizadas a 120°C durante 3 horas e a expansão da região de interesse com o início da degradação do material.



Fonte: Elaborado pelo autor

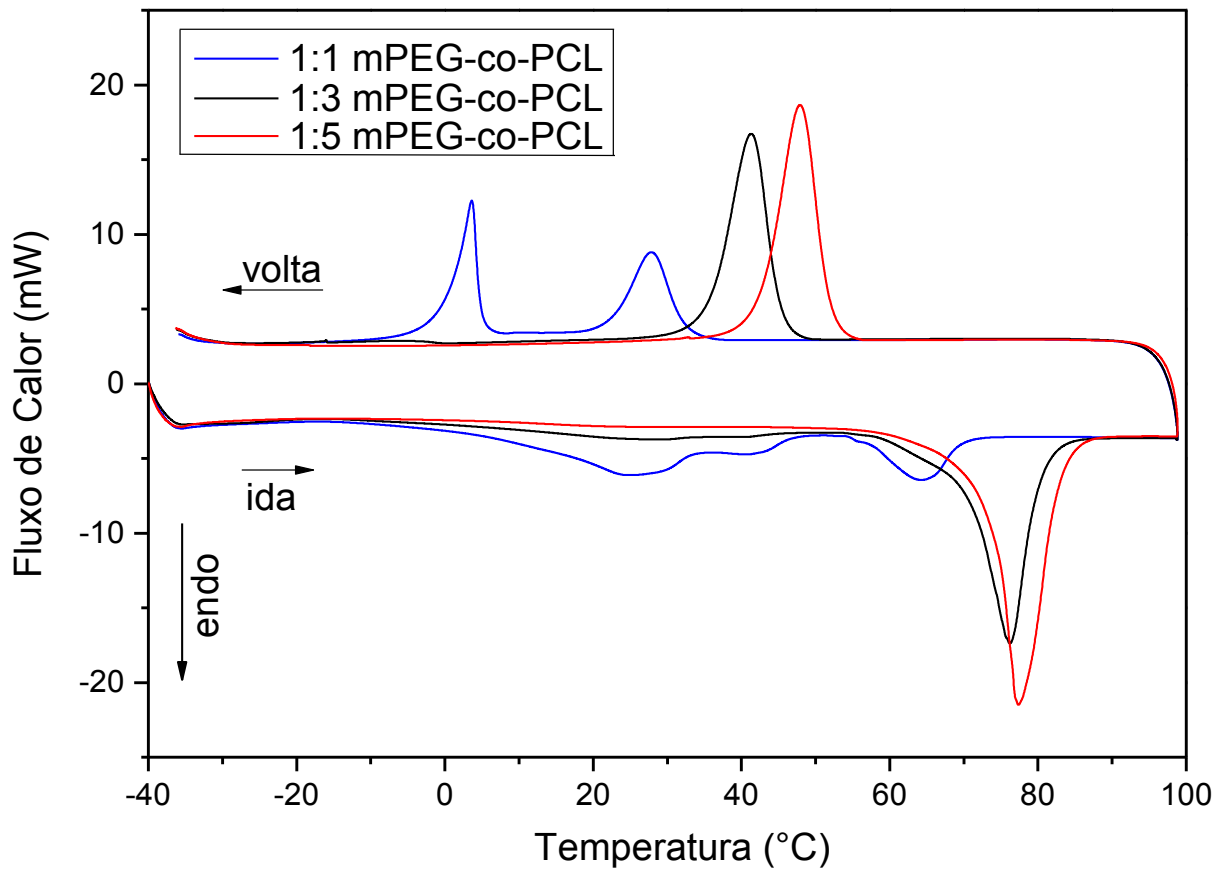


**Fonte:** Elaborado pelo autor

A curva referente à composição 1:1 representada na **figura 7** mostra que a amostra começa a se decompor em 180°C enquanto as composições 1:3 e 1:5 tem início de decomposição em 200°C e 215°C, respectivamente. Baseando-se nessas constatações, a temperatura máxima na qual poderiam ser realizadas as demais sínteses foi 180°C, pois mesmo o copolímero tendo início sua decomposição, o tempo de síntese utilizado (3 horas) não foi suficiente para degradar o polímero. Isso foi confirmado através da espectroscopia de transmitância na região do infravermelho onde as bandas observadas nos espectros das amostras sintetizadas a 180°C durante 3 horas foram similares às bandas apresentadas pelas amostras das outras condições utilizadas (120°C por 3 horas e 24 horas).

Complementando o estudo térmico realizado pela termogravimetria, foi efetuada a calorimetria diferencial de varredura (DSC) a fim de identificar e caracterizar as possíveis transições presentes no copolímero com a variação da temperatura. A **figura 8** mostra o termograma do copolímero frente à variação de temperatura.

**Figura 8** – Curva de Calorimetria Diferencial de Varredura do copolímero mPEG-co-PCL nas composições 1:1, 1:3 e 1:5.



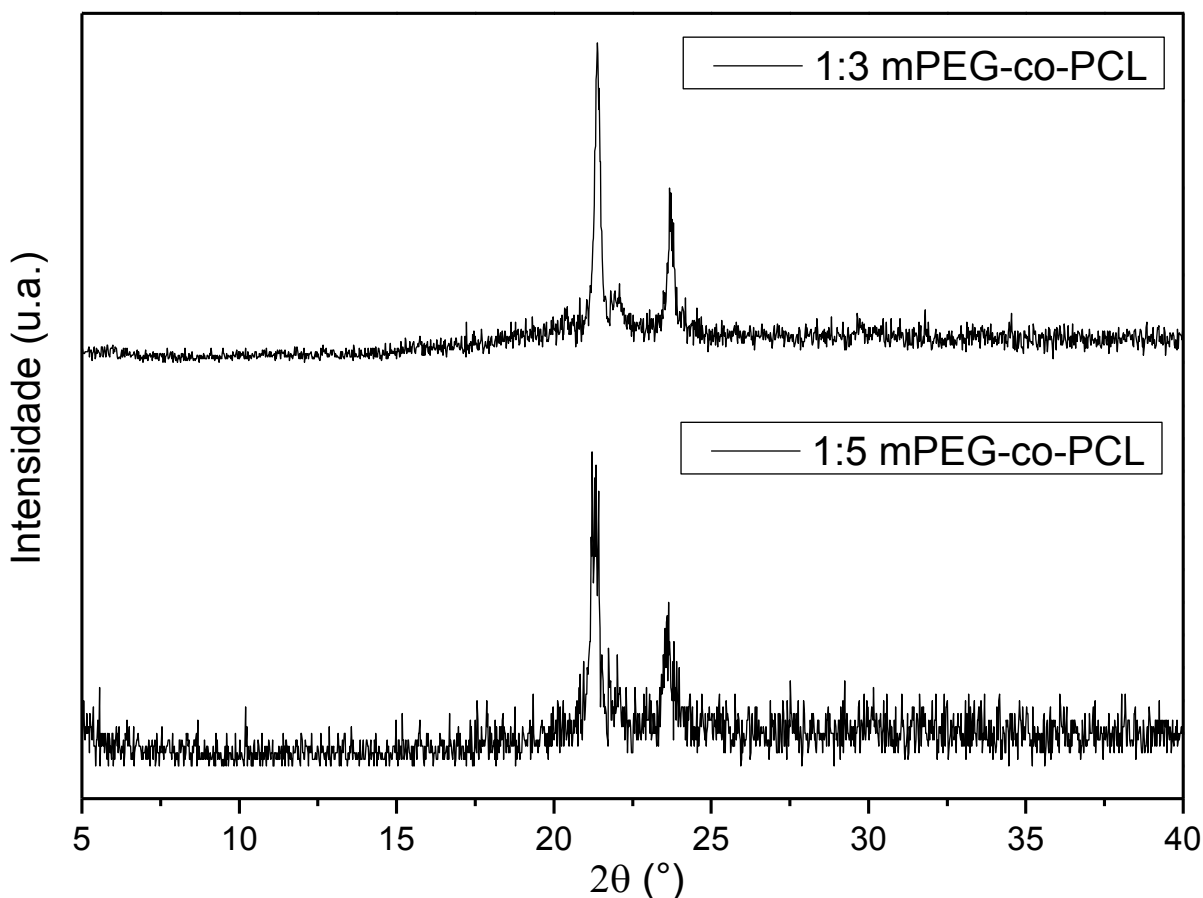
Fonte: Elaborado pelo autor.

O termograma apresentado na **figura 8** mostra algumas transições presente no copolímero em função de seus constituintes. Foi identificado o pico endotérmico característico do segmento PCL do copolímero referente ao processo de fusão ( $T_m$ ), esses picos se apresentam a 64,3°, 76,4° e 77,0° C provenientes das composições 1:1, 1:3 e 1:5, respectivamente (31,33). Conforme o aumento do segmento PCL no copolímero, o qual é responsável pela característica semicristalina da amostra, maior será o fluxo de calor e a temperatura para a fusão, isto é verificado com o aumento do fluxo de calor da amostra 1:1 apresentando -6,55 mW e 64,3° C para a amostra 5:1 apresentando -21,7 mW e 77,0° C. Devido às limitações impostas pelo equipamento, não foi possível identificar o pico referente à transição vítrea ( $T_g$ ) uma vez que esse se apresenta próximo a -61°C e o limite do equipamento era -40°C. Devido a maior fração das composições serem de PCL, foi identificado seu pico exotérmico característico de cristalização ( $T_c$ ) para as três composições. Esses picos

se apresentaram em 27,8°, 41,3° e 48,0° C para as composições 1:1, 1:3 e 1:5, respectivamente (31,33). O comportamento dos picos de cristalização foi similar aos de fusão, pois a menor composição (1:1) apresentou ambos os picos em temperaturas e intensidades menores enquanto a maior composição (1:5) apresentou os picos em temperaturas e intensidades maiores. Isso ocorre devido ao segmento PCL presente em cada composição, uma vez que esses picos são provenientes deste segmento no copolímero, portanto, quanto maior o segmento PCL no copolímero, maior a temperatura e fluxo de calor para que ocorra a devida transição. A amostra 1:1 apresentou comportamento diferente durante o aquecimento quando comparado às outras amostras. Isto ocorreu devido ao estado físico da amostra ao ser realizado a análise. Enquanto as amostras 1:3 e 1:5 se apresentaram sólido fino branco, a amostra 1:1 se apresentou gelatinosa. Portanto, a diferença do estado físico contribui para a menor intensidade da temperatura de fusão e o surgimento da região de picos entre 0° e 50° C, correspondentes à perda fracionada da estrutura do copolímero. Para a amostra 1:1 é observado um pico durante o resfriamento do copolímero em 3° C. Este pico pode ser atribuído ao processo de transição sol-gel do copolímero, denominada temperatura de transição sol-gel ( $T_{g-s}$ ) (12,34).

Foi realizado o estudo cristalográfico a fim de identificar os picos referentes à fração PCL do copolímero formado, responsável pela característica semicristalina da amostra. Em virtude dessa característica da PCL, não foi realizado o difratograma da amostra 1:1 mPEG-co-PCL por apresentar a menor fração PCL dentre as outras amostras e o estado físico da mesma se apresentou com aspecto gelatinoso, impossibilitando a realização da medida. A **figura 9** mostra o difratograma das amostras 1:3 e 1:5.

**Figura 9** – Difratoograma das amostras 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.

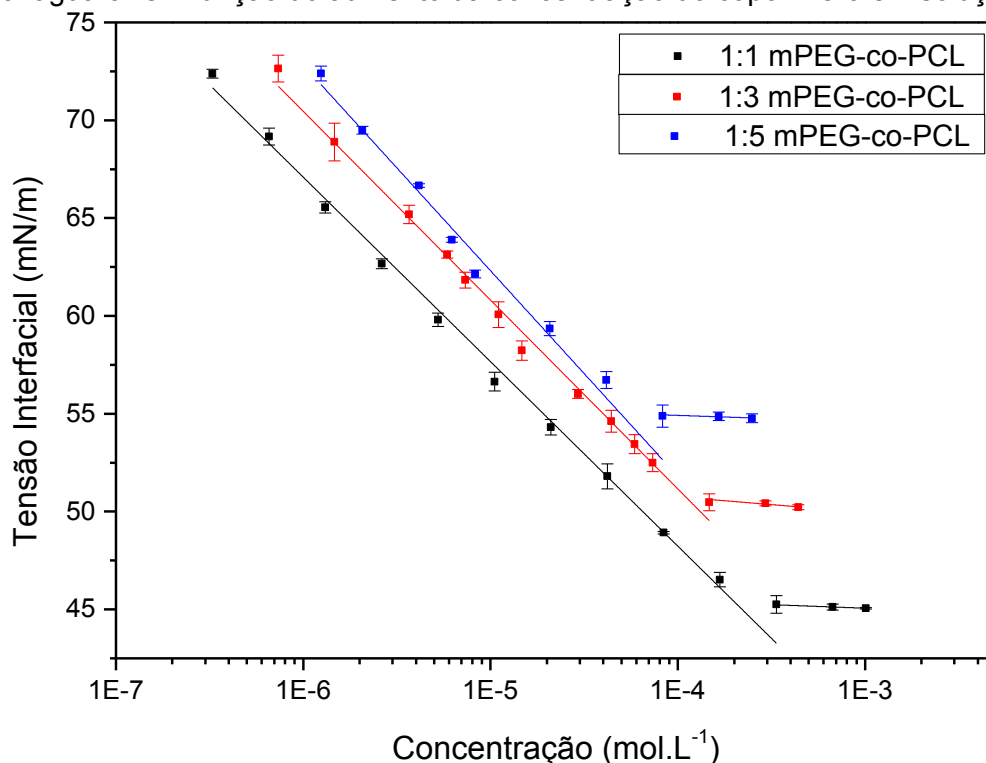


Fonte: Elaborado pelo autor.

Por meio do difratograma, é possível visualizar dois picos referentes à fração semicristalina da PCL em  $21,4^\circ$  e  $23,6^\circ$ . Em comparação com SHI, S.; et al. e KIM, M. S., et al., os ângulos observados estão próximos ( $21,3^\circ$  e  $23,5^\circ$ ) aos apresentados, conferindo confiabilidade ao resultado (34,35).

Para que fosse possível realizar o estudo da estabilidade coloidal, a morfologia e a incorporação/liberação do metotrexato foi necessário determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC) das composições utilizadas nas micelas sintetizadas. Na **figura 10** estão representados os gráficos referentes às três composições (1:1, 1:3 e 1:5), onde foi possível determinar a (CMC) de cada composição.

**Figura 10** – Determinação da Concentração Micelar Crítica a partir da Tensão Interfacial água-ar em função do aumento da concentração do copolímero em solução.



Fonte: Elaborado pelo autor

Através das curvas plotadas na **figura 10**, foi possível determinar a CMC de cada composição em meio aquoso, ou seja, a concentração mínima necessária para a formação das micelas. Para a determinação da CMC foi utilizado o método da Gota Pendente através do equipamento Goniômetro. Por meio deste, partindo-se de uma solução aquosa concentrada do copolímero em uma seringa, pressionou-se o embolo desta até a formação de uma gota da solução na eminência de se desprender. A partir disso, a câmera do equipamento capturou uma foto da gota e esta teve seu contorno delimitado por uma linha. A partir do contorno, utilizando a equação de Young-Laplace, determinou-se a tensão interfacial solução-ar das amostras. Esta equação descreve a diferença de pressão capilar na interface de dois fluidos estáticos, tais como água e ar, devido ao fenômeno da tensão superficial (36). A amostra 1:1 apresentou a maior CMC,  $2,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , seguido da 1:3 com a CMC intermediária,  $1,12 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e por fim a amostra 1:5 com a menor CMC,  $4,90 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Essa diminuição da CMC entre as amostras é devido ao crescimento do segmento hidrofóbico do PCL na cadeia. Isto ocorre, pois o aumento da cadeia gera maior repulsão entre os grupos metilênicos do PCL (apolar) e as

moléculas de água (polar) que o rodeiam, portanto estes, numa tentativa de minimizar esta repulsão, se auto organizam em micelas numa concentração menor do que as amostras com segmentos hidrofóbicos menores.

Por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS), foi possível determinar o diâmetro hidrodinâmico médio das micelas formadas. A **tabela 5** expressa os dados obtidos a partir da realização das medidas.

**Tabela 5** – Diâmetro hidrodinâmico obtido das amostras de composição variada na condição de síntese de 120 °C durante 3 horas.

Composição (m:m) mPEG-co-PCL	$D_h$ /nm	Pdl
1:1	122 ± 11	0,42 ± 0,04
1:3	199 ± 11	0,44 ± 0,06
1:5	247 ± 8	0,52 ± 0,02

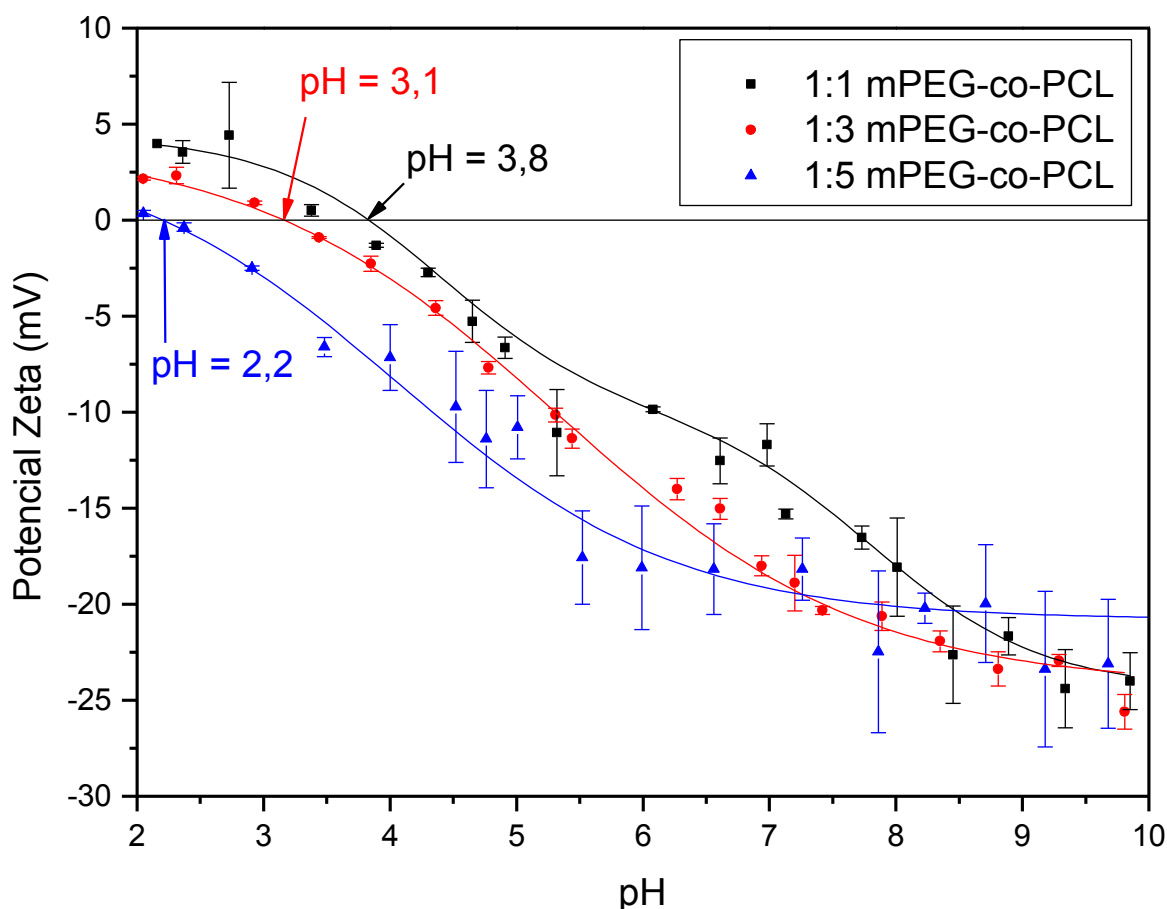
**Fonte:** Elaborado pelo autor

Conforme os valores apresentados na **tabela 5** comprova-se que o tamanho das micelas formadas é diretamente proporcional ao aumento da massa do copolímero sintetizado, pois com esse aumento, as cadeias poliméricas crescem e conseqüentemente o diâmetro das micelas. As amostras em geral se apresentaram polidispersas uma vez que a faixa de valores para polidispersão é entre 0 e 1, sendo 0 a amostra totalmente monodispersa e 1 a amostra polidispersa. A faixa de tamanho observada para micelas de mPEG-co-PCL está entre 30 – 80 nm (37). Os valores de diâmetro hidrodinâmico obtidos estão acima dessa faixa e o fato da polidispersão ser elevado indica a falta de estabilidade destas em meio aquoso.

A avaliação da estabilidade micelar foi realizada com base no comportamento do polímero frente ao aumento de temperatura e variação de valores do pH, como estudos do diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura e do pH e do potencial zeta em função do pH. A faixa de temperatura de estudo foi próxima à temperatura encontrada no corpo humano. A faixa de pH estudada também foi baseada nos valores de pH encontrados no corpo humano uma vez que a aplicação dos carreadores sintetizados é através da absorção na mucosa intestinal, logo os valores de pH podendo chegar a pH = 2 quando no estômago e pH = 8 no intestino. Os copolímeros sintetizados não apresentam estabilidade coloidal significativa uma

vez que os mesmos não apresentam potencial zeta abaixo de -30 mV (10). Esse valor de potencial zeta, tanto positivo quanto negativo, confere à micela estabilidade em função da repulsão eletrostática, o que impede a agregação de ocorrer. Por meio do gráfico de potencial zeta em função do pH apresentado na **figura 11**, permitiu prever a estabilidade das micelas quanto a possível agregação das mesmas frente a mudanças nos valores de pH do meio.

**Figura 11** – Variação do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) em função do pH das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.



Fonte: Elaborado pelo autor

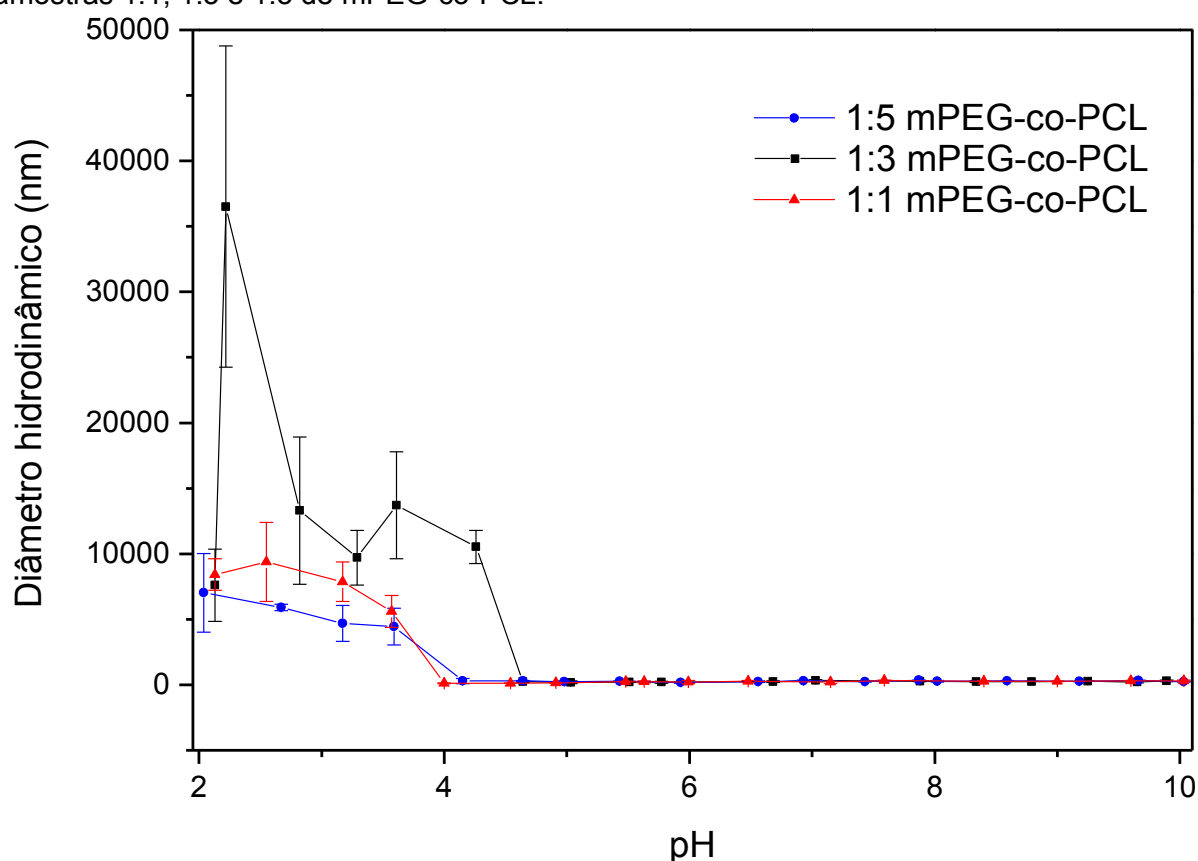
Conforme observado no gráfico da **figura 11**, devido à repetição da grande quantidade de grupos ésteres presente na cadeia do copolímero, faz com que a curva apresente o comportamento indicado no gráfico, ou seja, os grupos ésteres possuem momento dipolar onde a maior densidade de elétrons se localiza no átomo de oxigênio da carbonila, fazendo com que estes grupos ésteres apresentem características básicas (sendo éster a base conjugada do ácido carboxílico) conferindo ao copolímero um potencial zeta negativo na faixa de pH estudada. Ao



fixar o valor de pH em 7 (solução neutra, condição semelhante onde foram realizados outros estudos sobre o material), é possível observar que a amostra 1:1 apresenta maior valor de potencial zeta,  $-9,7$  mV, enquanto as amostras 1:3 e 1:5 apresentam potencial zeta menores,  $-13,8$  e  $-17,2$  mV respectivamente. A explicação para isso seria o aumento da cadeia polimérica, o que permitiu um aumento de grupos ésteres presentes na cadeia onde os átomos de oxigênio da carbonila atuassem como bases de Lewis e conferissem um ponto isoelétrico menor e potencial zeta menor no decorrer da curva com o aumento nos valores de pH.

A estabilidade das micelas frente à variação do pH foi verificada entre os valores de pH 2 e 10 demonstrada na **figura 12**.

**Figura 12** – Diâmetro hidrodinâmico em função da variação dos valores de pH das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

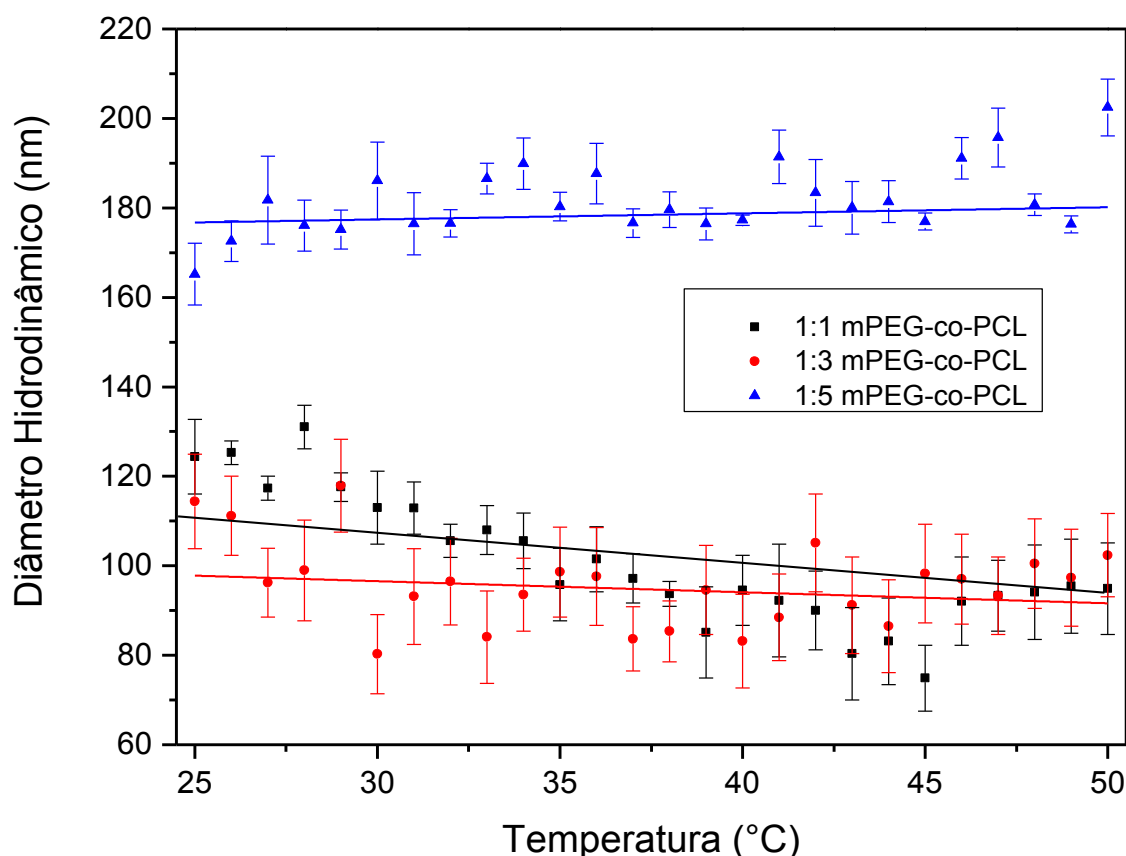
As curvas apresentadas na **figura 12** mostram que o efeito do pH sobre as estruturas das micelas é significativo. As três composições sofrem o mesmo efeito: em valores de pH mais baixos (pH 4,00 – 1:1, pH 4,15 – 5:1 e pH 4,64 – 3:1), quando o meio está ácido, as micelas tendem a agregar formando grandes aglomerados (p.

ex. na composição 1:3, o diâmetro médio dos agregados atingem cerca de 35.000 nm). A amostra 1:3 sofreu maior efeito do pH em relação às outras duas composições, porém não foi possível identificar um padrão já que a amostra 1:5 sofreu menos o efeito do pH enquanto a composição intermediária sofreu mais dentre todas.

Comparando-se as **figuras 11 e 12**, referentes à estabilidade das micelas frente à mudança do pH e a resposta no potencial zeta em função desta mudança, é possível observar que estas desestabilizam próximo a valores de pH 4. Isto ocorre, pois neste valor de pH, o potencial zeta das amostras é ou está muito próximo de zero, logo há diminuição da repulsão eletrostática que impeça as micelas de permanecerem dispersas.

A avaliação da estabilidade micelar frente à temperatura foi realizada entre 25° C e 50° C, contendo a faixa de temperatura encontrada no corpo humano, de 36,5° a 37,7° C (38). A **figura 13** abaixo demonstra o comportamento das micelas em função ao aumento da temperatura.

**Figura 13** – Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura das amostras 1:1, 1:3 e 1:5 de mPEG-co-PCL.

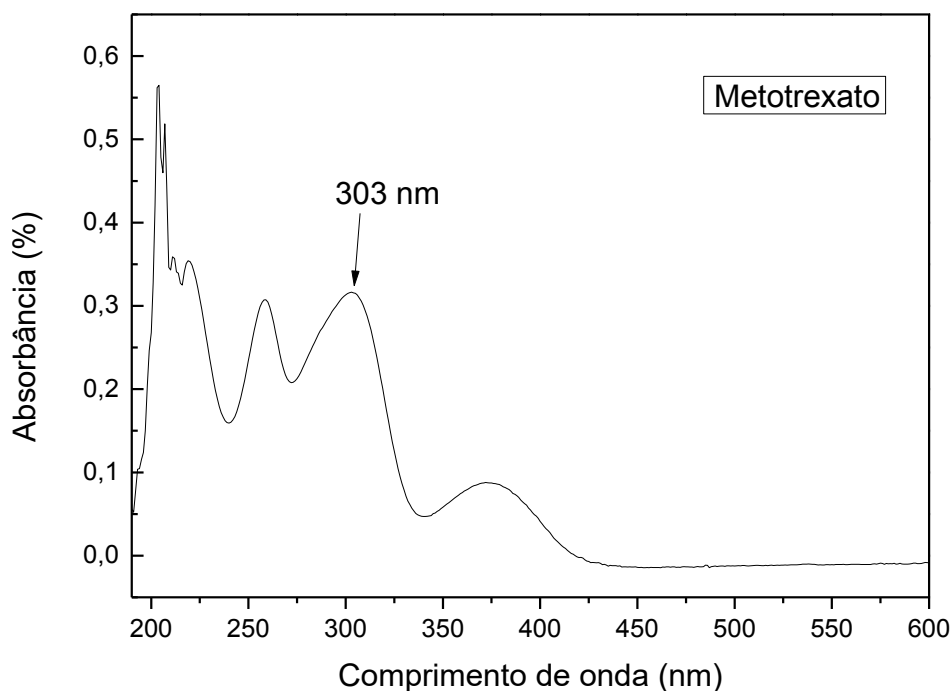


Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando o gráfico apresentado na **figura 13**, observa-se certa flutuação das medidas em relação ao diâmetro hidrodinâmico das micelas nas três composições citadas no gráfico, porém tal flutuação não compromete a medida. O comportamento das curvas mostra que, independente da composição utilizada, as micelas do copolímero mPEG-co-PCL não sofrem efeitos de mudanças estruturais, tal como agregação, no aumento da temperatura. Se aplicadas ao corpo humano, as micelas incorporadas com o fármaco não sofrerão alterações (rompimento de ligações ou agregação) quando o corpo estiver em temperaturas normais (entre  $36,8 \pm 0,4$  °C (38)) ou estado febril (acima de  $37,5$ ° C (38)). Dessa forma o aumento de temperatura para o copolímero mPEG-co-PCL não atua como estímulo para a liberação do fármaco em meio biológico.

Para os estudos de incorporação do fármaco Metotrexato pelo copolímero, inicialmente foi obtido uma curva de absorção do metotrexato no qual foi selecionado o comprimento de onda utilizado nas medidas de incorporação e liberação. A **figura 14** apresenta o espectro de absorbância do fármaco Metotrexato na região do ultravioleta e visível. Posteriormente, a obtenção de uma curva de calibração com concentrações de metotrexato variando de 0 a  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , esta curva está representada na **figura 15**.

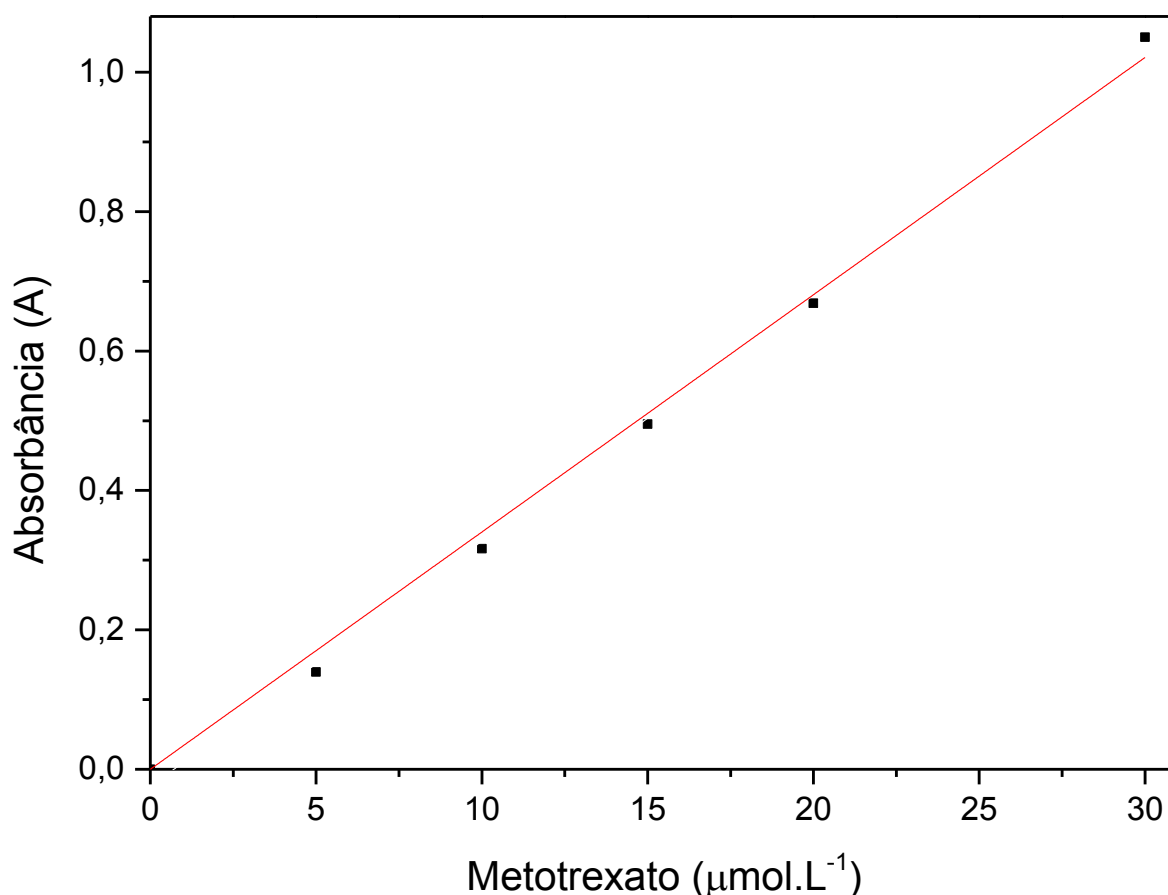
**Figura 14** – Espectro de absorbância do fármaco metotrexato na região do ultravioleta e visível.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O comprimento de onda escolhido para a análise do fármaco Metotrexato para a incorporação deste no copolímero foi 303 nm. Este comprimento de onda foi escolhido, pois era o que apresentava maior intensidade dentre os outros. Existem comprimentos de onda no qual há maior absorção da radiação incidente, no entanto estas bandas se localizam na extremidade inferior da faixa de comprimentos de onda em que o equipamento analisa. A fim de minimizar o erro inerente do equipamento obtido nas medidas, que nas extremidades da faixa são maiores quando comparados ao erro em valores encontrados no meio da faixa, foi escolhido um comprimento de onda no qual não se localizasse na extremidade da faixa e que se apresenta a maior absorção.

**Figura 15** – Curva de calibração do fármaco metotrexato em comprimento de onda 303 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da curva de calibração apresentado na **figura 15**, foi obtido a equação da reta que posteriormente foi utilizada para a determinação da concentração de metotrexato não incorporado e a quantidade de metotrexato liberado em função do

tempo. A equação da reta é:

$$f(x) = 0,03400 \cdot x,$$

**Equação 3**

na qual  $f(x)$  é a absorvância medida em A e  $x$  é a concentração de metotrexato em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Verifica-se que a equação segue a Lei de Lambert-Beer, ou seja, há uma linearidade entre os valores de absorvância e a concentração do fármaco.

Foram realizadas medidas de absorvância no sobrenadante das soluções contendo as micelas após o período de incorporação (24 h) e, sabendo-se a massa de fármaco inicial adicionada e a massa que permaneceu em solução após esse tempo, determinou-se a eficiência de incorporação e o coeficiente de incorporação. Estes dados são apresentados na **tabela 6**.

**Tabela 6** – Influência da variação de composição do copolímero na eficiência de incorporação do fármaco metotrexato.

Composição (m:m) mPEG-co-PCL	Coeficiente de Incorporação (%)	Eficiência de Incorporação (%)
1:1	2,86	88,40
1:3	3,01	93,06
1:5	3,04	94,03

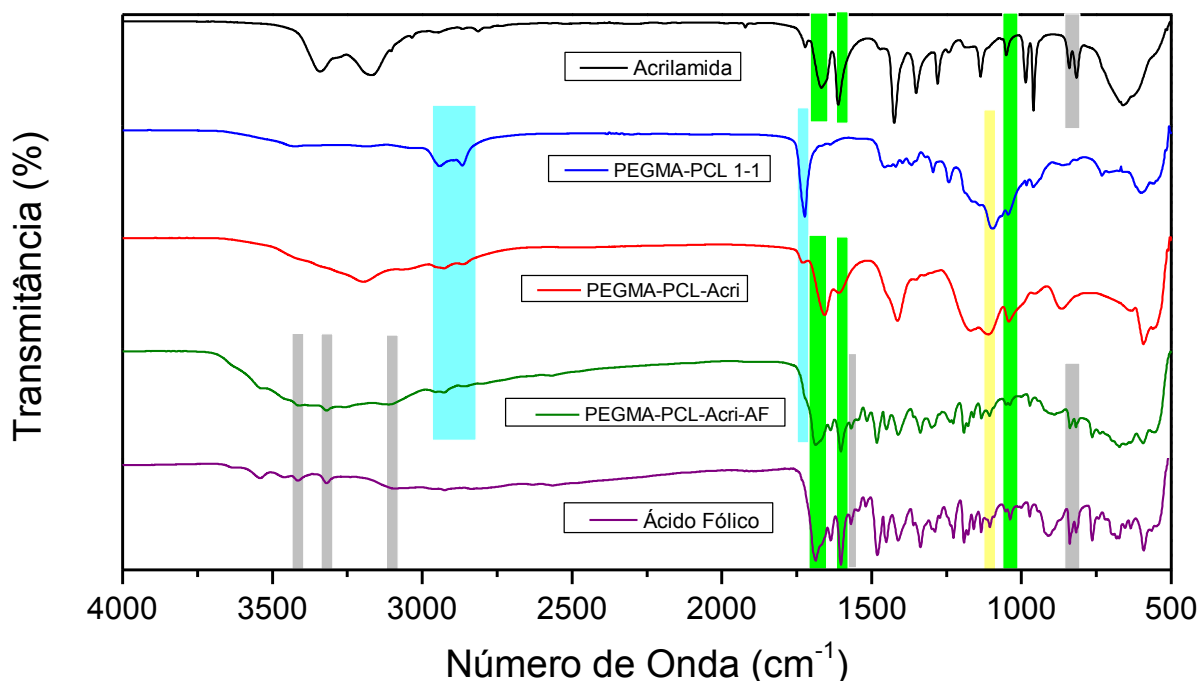
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

De acordo com os dados apresentados na **tabela 6**, é possível atestar a influência da composição na incorporação do fármaco. O aumento no segmento hidrofóbico referente ao PCL do copolímero sintetizado provocou um aumento na quantidade de metotrexato incorporado já que o mesmo apresenta características hidrofóbicas semelhantes às encontradas no segmento PCL do copolímero. Portanto, o aumento da fração PCL do copolímero possibilita maior superfície de interação com o fármaco, resultando em maior incorporação entre as cadeias hidrofóbicas. Os altos valores de incorporação são devidos as fortes interações intermoleculares entre o copolímero e o fármaco, sendo principalmente as interações apolares.

#### 4.2. COPOLÍMERO PEGMA-co-PCL FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO FÓLICO

A síntese do copolímero dibloco PEGMA-co-PCL funcionalizado com ácido fólico ocorreu em três etapas. A 1ª etapa se resumiu na síntese do copolímero PEGMA-co-PCL na proporção 1:1 (m/m), a 2ª etapa na reação de polimerização radicalar do copolímero com acrilamida e a última etapa, a reação de condensação com o ácido fólico. A rota sintética original, proposta no projeto, previa a formação do copolímero funcionalizado a partir de quatro etapas. Portanto, houve a redução de uma etapa ocasionando, principalmente, menor tempo de síntese e menor quantidade de reagentes utilizados. A **figura 16** indica o espectro de transmitância na região do infravermelho para a amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF 1:1 junto das amostras do copolímero após cada etapa sintética.

**Figura 16** – Espectro de transmitância na região do infravermelho das amostras do copolímero PEGMA-co-PCL-Acri-AF obtido a cada etapa sintética e os reagentes precursores ao produto final, referente ao copolímero funcionalizado com ácido fólico.



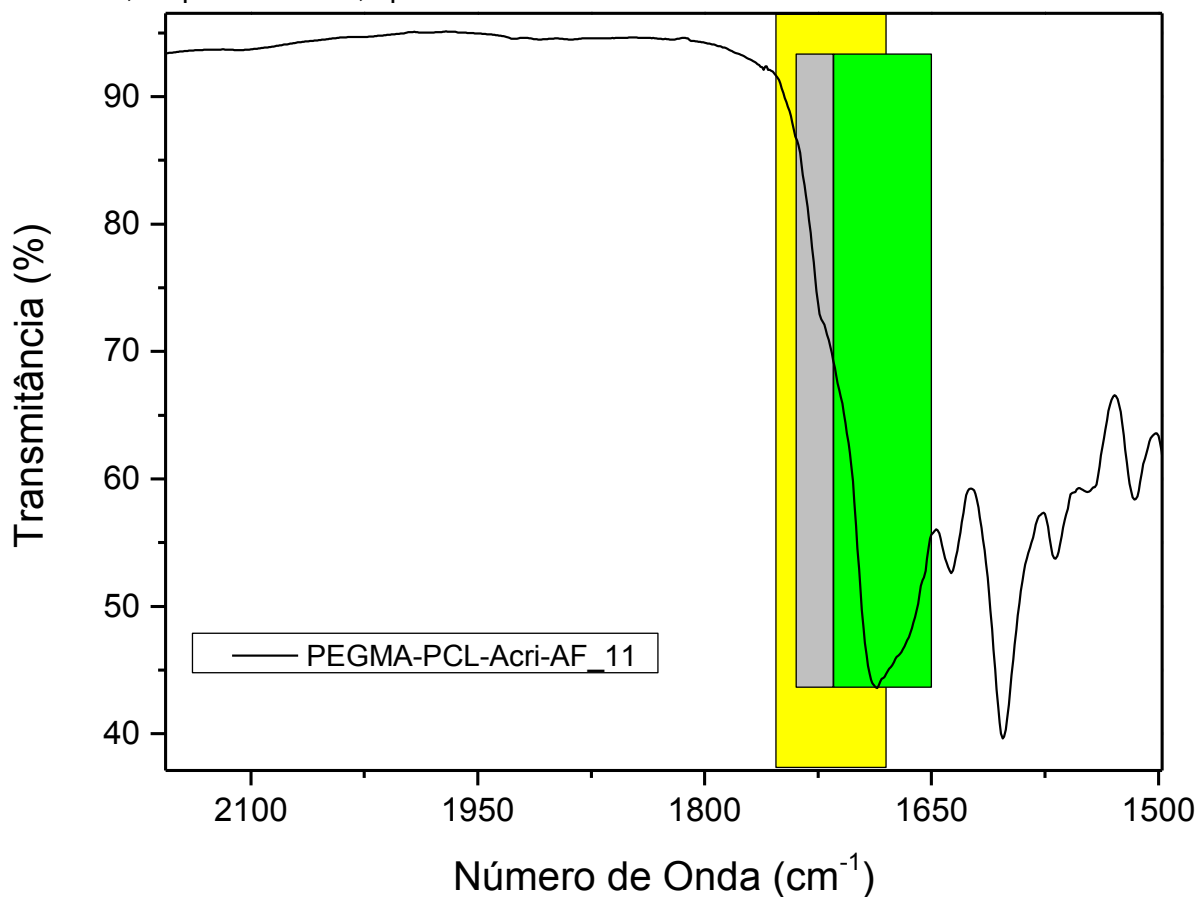
Fonte: Elaborado pelo autor.

Por meio da **figura 16** foi possível observar que o produto final possui bandas provenientes dos reagentes precursores. A banda fraca em 2940 e 2866  $\text{cm}^{-1}$  deve-se ao estiramento C–H dos grupos metilênicos ( $-\text{CH}_2-$ ) localizados na maior parte

da cadeia polimérica e esta identificada na **figura 16** pela cor azul. A intensidade desta banda diminui com as reações subseqüentes. Isto ocorre, pois com o aumento da quantidade de grupos funcionais diferentes, faz com que a intensidade da banda dos grupos metilênicos diminua. O estiramento da ligação C=O foi observado em  $1720\text{ cm}^{-1}$  que condiz com grupos carbonila referentes à ligação éster proveniente da cadeia de policaprolactona, identificada na **figura 16** pela cor azul. Esta banda é intensa na amostra PEGMA-co-PCL sem funcionalização, porém com a adição da acrilamida e da funcionalização com o ácido fólico, a banda de carbonila (éster) perde intensidade em comparação com a banda da amida que surge proveniente da acrilamida e da junção do copolímero com ácido fólico. As bandas da amida não substituída ( $\text{CONH}_2$ ) são observadas aproximadamente em  $1690$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  para os precursores acrilamida e ácido fólico e para as amostras de PEGMA-co-PCL-Acri e PEGMA-co-PCL-Acri-AF. As bandas referentes à amida estão identificadas pela cor verde. Foi possível observar bandas do estiramento C–O em números de onda diferentes, em torno de  $1090$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Apenas o reagente precursor acrilamida não possui esta banda, pois o mesmo não possui a ligação C–O. As bandas que aparecem entre  $700$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à estrutura do esqueleto da cadeia do copolímero (dobramento, oscilação e alongamento dos grupos metilênicos), do ácido fólico e isomerização *gauche–trans* do grupo éster do copolímero (7,9,10,31). Foram identificadas bandas de amidas monossustituídas no copolímero em  $3413$ ,  $3320$  e  $3110\text{ cm}^{-1}$ , provenientes do ácido fólico. Essas bandas de amidas monossustituídas estão identificadas em cinza. A banda de interesse que caracteriza a formação da ligação entre a acrilamida e o ácido fólico é, aproximadamente, em  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda no ácido fólico está em  $1575\text{ cm}^{-1}$  enquanto na amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF está em  $1562\text{ cm}^{-1}$ . Essa diferença é significativa uma vez que grupos que não atraem elétron para o nitrogênio diminuem o número de onda da frequência C=O da amida. O grupo amida presente no ácido fólico possui como grupo substituinte um carbono tetraédrico enquanto na amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF possui o grupo carbonila como substituinte. O fato de ser uma carbonila caracteriza esse grupo de imida ( $\text{CONHCO}$ ). Este grupo se forma na reação de condensação entre o ácido carboxílico do ácido fólico e o grupo amida da acrilamida. A banda característica do grupo imida aparece na mesma região que as bandas de amida e de carbonila, todas de alta intensidade, dessa forma ocorre à sobreposição das bandas. Esta sobreposição pode ser observada na **figura 17**, na

qual as cores cinza, verde e amarelo indicam a região espectral do aparecimento dos grupos funcionais carbonila (éster), amida (não e monossubstituída) e imida, respectivamente.

**Figura 17** – Região espectral no qual há o aparecimento das bandas dos grupos funcionais carbonila (éster), amida (não e monossubstituída) e imida nas cores cinza, verde e amarelo, respectivamente, aplicados à amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

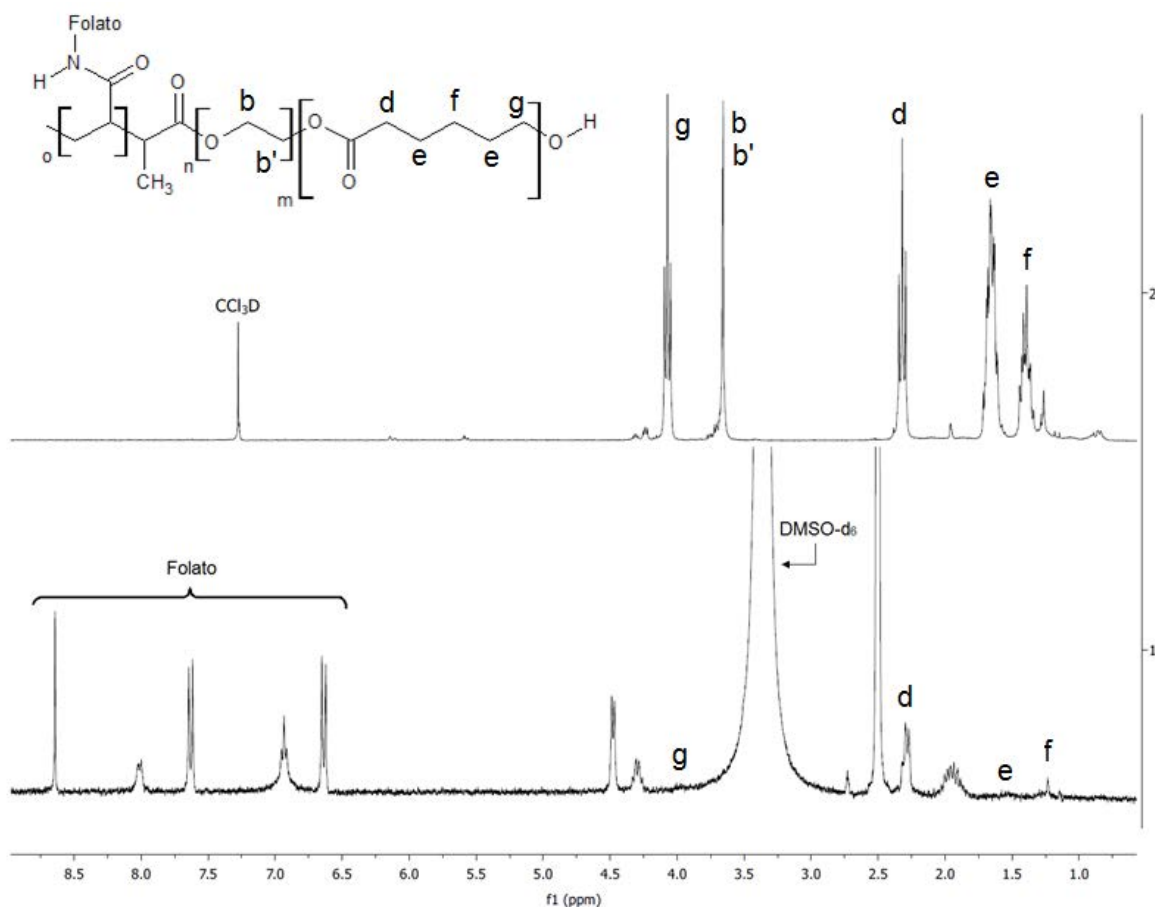
Observa-se a partir da **figura 17** que a banda aproximadamente em 1690 cm<sup>-1</sup> é larga e possui um ombro em 1720 cm<sup>-1</sup>. As atribuições a estes picos já foram feitas anteriormente no texto. A largura da banda como um todo indica a sobreposição das bandas individuais e por essa característica, está mascarando a banda do grupo imida. As informações obtidas a partir da interpretação dos espectros de transmitância na região do infravermelho das amostras e dos reagentes precursores foram corroboradas com os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons para os mesmos.

A **figura 18** apresenta os espectros de ressonância magnética nuclear de



prótons das amostras PEGMA-co-PCL e PEGMA-co-PCL-Acri-AF. Não foi necessário realizar um espectro da amostra intermediária PEGMA-co-PCL-Acri, pois tanto a acrilamida quanto o PEG-metacrilato apresentam os picos dos grupos vinílicos na mesma região (5.8 e 6.2 ppm).

**Figura 18** – Espectro de ressonância magnética nuclear de próton das amostras (1) PEGMA-co-PCL-Acri-AF e (2) PEGMA-co-PCL 1:1 e as respectivas atribuições dos picos observados.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Através da **figura 18** foi possível observar o surgimento de picos dos prótons aromáticos referentes à molécula de ácido fólico na amostra PEGMA-co-PCL-Acri-PCL. Estes picos se apresentam no intervalo de 6.5 a 8.7 ppm. O desaparecimento dos picos em 5.8 e 6.2 indica o sucesso da polimerização radicalar entre os grupos vinílicos presentes tanto na acrilamida quanto no PEG-metacrilato. Os picos referentes ao copolímero PEG-co-PCL aparecem entre 1.0 e 4.0 ppm, intervalo similar àquele dos picos do copolímero mPEG-PCL. Os picos em 1.3, 1.6, 2.3 e 3.9 são atribuídos aos grupos metilênicos presentes na cadeia do segmento PCL do

copolímero enquanto o pico do segmento PEG é observado em 3.7 ppm. No espectro (2), referente à amostra PEGMA-co-PCL 1:1, devido à mesma proporção mássica entre a quantidade de PEGMA e PCL no copolímero, todos os sinais apresentam intensidades semelhantes. Já na amostra (1) – PEGMA-co-PCL-Acri-AF – devido à polimerização radicalar do copolímero com acrilamida e a funcionalização com ácido fólico, em comparação aos sinais do copolímero, os picos do ácido fólico se apresentaram mais intensos. O sinal do solvente DMSO-d<sub>6</sub> utilizado na solubilização da amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF, devido sua intensidade elevada (amostra diluída), suprimiu os picos b e b' referentes ao segmento PEG do material.

Em complementariedade às informações obtidas a partir das espectroscopias de transmitância na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton, determinou-se a massa molecular do copolímero funcionalizado através de cromatografia de exclusão por tamanho. Os valores de massa molecular do copolímero funcionalizado estão representados na **tabela 7**.

**Tabela 7** – Massas moleculares dos copolímeros mPEG-co-PCL e PEGMA-co-PCL-Acri-AF obtidas por cromatografia de exclusão por tamanho.

Amostra	Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )		
	Mn	Mw	Mw / Mn
mPEG-co-PCL 1:1	2976	3375	1,134
PEGMA-co-PCL-Acri-AF	1430	2710	1,895

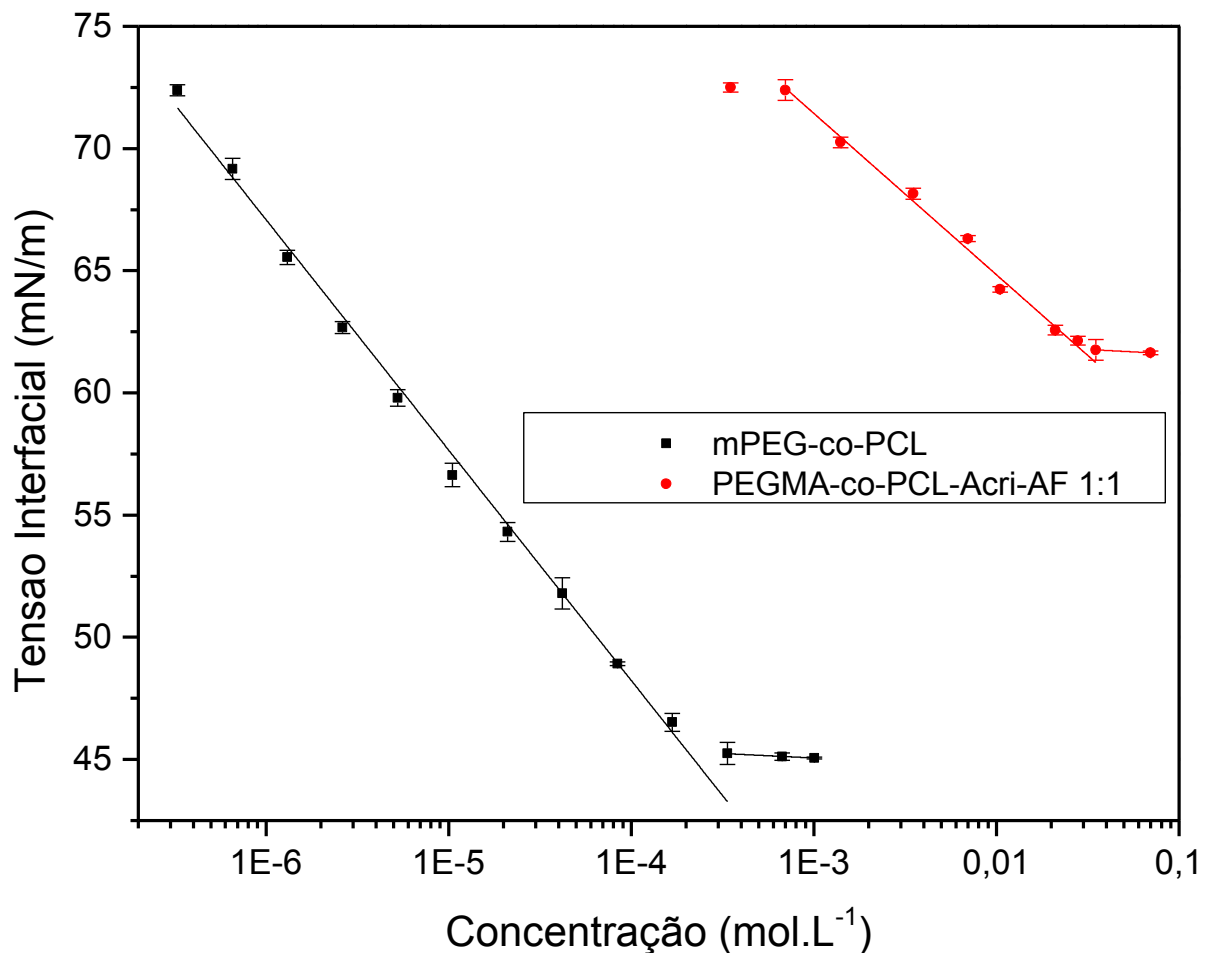
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Observa-se, com base na **tabela 7**, que o copolímero funcionalizado apresentou menor massa molecular quando comparado à amostra sem funcionalização. A massa molecular menor pode ser resultado do processo sintético com acrilamida e com o ácido fólico. Durante a síntese do copolímero PEGMA-co-PCL, obteve-se copolímeros com distribuição gaussiana de massas moleculares, conforme esperado da síntese de polímeros em geral. A reação entre PEGMA-co-PCL e Acrilamida foi realizada em meio aquoso, portanto os copolímeros que apresentaram os menores valores de massa molecular na distribuição foram mais solúveis, pois estes possui a maior razão PEGMA:PCL (por exemplo, valores da razão sendo PEGMA:PCL 1:0,9, com o segmento PCL levemente menor que o PEGMA), mesmo a proporção mássica utilizada na síntese fosse 1:1. Logo, o

material que foi sintetizado, lavado, funcionalizado com ácido fólico e caracterizado apresentou a menor massa molecular, pois este foi obtido durante as etapas citadas acima.

Para o estudo da estabilidade micelar do copolímero funcionalizado com ácido fólico, inicialmente foi necessário determinar a concentração micelar crítica (CMC) do material. A diminuição da tensão interfacial solução (polímero + água) em função da concentração está representada na **figura 19**.

**Figura 19** – Determinação da Concentração Micelar Crítica a partir da Tensão Interfacial água-ar em função do aumento da concentração dos copolímeros mPEG-co-PCL 1:1 e PEGMA-co-PCL-Acri-AF.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da **figura 19**, observa-se que o comportamento das curvas de ambas as amostras é semelhante, ou seja, há o decréscimo da tensão interfacial proporcional ao aumento da concentração de copolímero em solução. Verificou-se que a CMC para a amostra mPEG-co-PCL é  $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  enquanto que para

amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF é  $2,90 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Para a amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF, a faixa de valores de concentração que levam à diminuição da tensão interfacial é maior que a faixa de concentração do copolímero mPEG-co-PCL. Essa diferença está diretamente relacionada à funcionalização das micelas com ácido fólico. A presença de grupos funcionais diferentes presente nesta molécula fornece à superfície do copolímero a possibilidade de ocorrer mais interações com as moléculas do solvente, neste caso a água. Desta forma, a atração (interações) entre o segmento PEGMA e ácido fólico (hidrofílicos) superam a repulsão do segmento PCL (hidrofóbico), fazendo com que a concentração micelar crítica seja maior. Esse aumento da CMC indica que é necessário maior quantidade de moléculas para que ocorra a formação de micelas no meio aquoso.

Através do espalhamento de luz dinâmico (DLS), determinou-se o diâmetro hidrodinâmico médio das micelas formadas a partir da amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF e comparou-se o diâmetro hidrodinâmico desta com o diâmetro da amostra mPEG-PCL 1:1. A **tabela 8** expressa os dados obtidos a partir da realização das medidas.

**Tabela 8** – Diâmetro hidrodinâmico obtido das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a  $120^\circ \text{ C}$  durante 3 horas em atmosfera inerte.

Amostra	$D_h$ /nm	Pdl
mPEG-co-PCL 1:1	$122 \pm 11$	$0,42 \pm 0,04$
PEGMA-co-PCL-Acri-AF	$190 \pm 7$	$0,37 \pm 0,04$

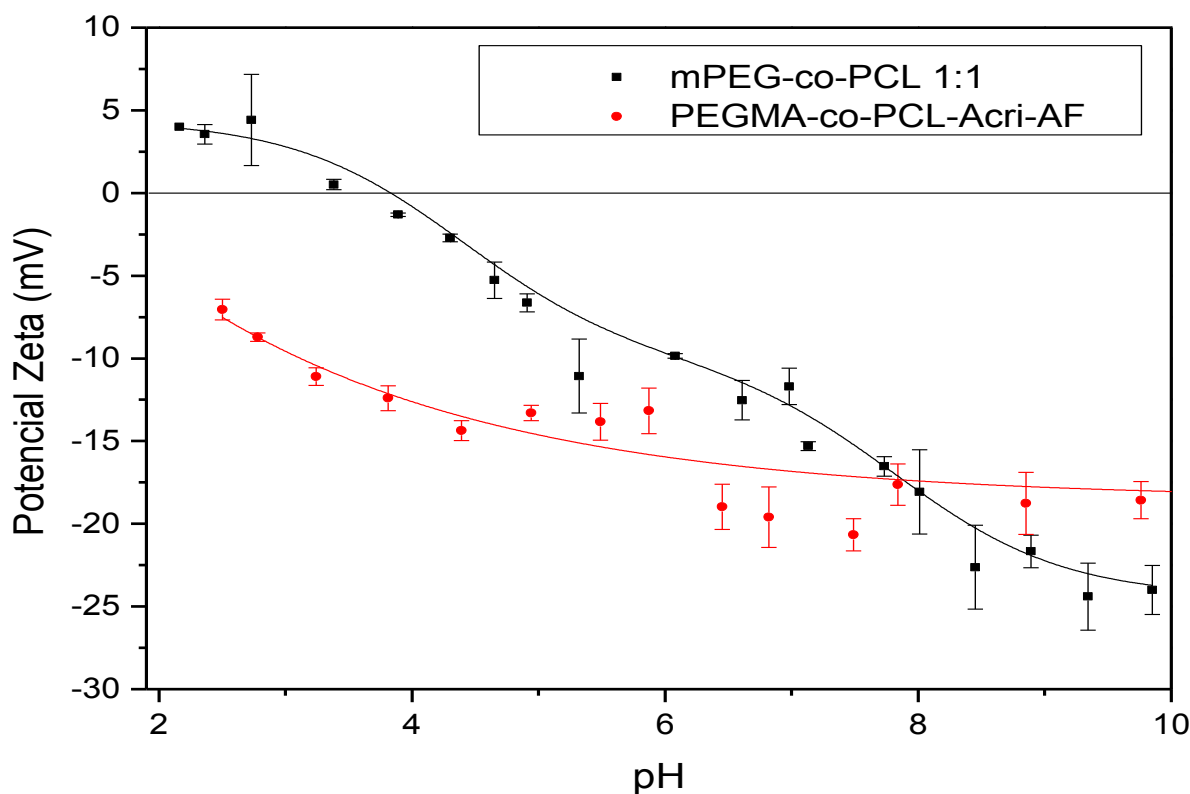
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Observa-se na **tabela 8** que o houve o aumento no tamanho das micelas formadas. Esse aumento é devido à funcionalização da superfície das micelas com os grupos acrilamida e folato. Proporcionalmente às quantidades de acrilamida e ácido fólico utilizados, a polimerização radicalar do PEGMA-co-PCL com acrilamida foi o responsável em maior parte pelo crescimento da micela. Ocorreu um decréscimo no índice de polidispersão, porém a diferença não é significativa a ponto de fazer afirmações sobre um aumento na estabilidade da amostra.

Para as micelas funcionalizadas com ácido fólico também foi realizada a avaliação da estabilidade micelar com base no comportamento desta amostra frente ao aumento de temperatura e variação de valores do pH, como estudos do diâmetro

hidrodinâmico em função da temperatura e do pH e do potencial zeta em função do pH. As condições de estudo permaneceram as mesmas, ou seja, a faixa de temperatura entre 25° e 50° C e entre os valores de pH 2 e 10. Devido à similaridade das condições de estudo, permitiu-se a comparação do comportamento entre as micelas mPEG-co-PCL e PEGMA-co-PCL-Acri-AF. Por meio do gráfico de potencial zeta em função do pH apresentado na **figura 20**, permitiu comparar a estabilidade das diferentes micelas quanto a possível agregação das mesmas frente a mudanças nos valores de pH do meio.

**Figura 20** – Variação do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) em função do pH das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.



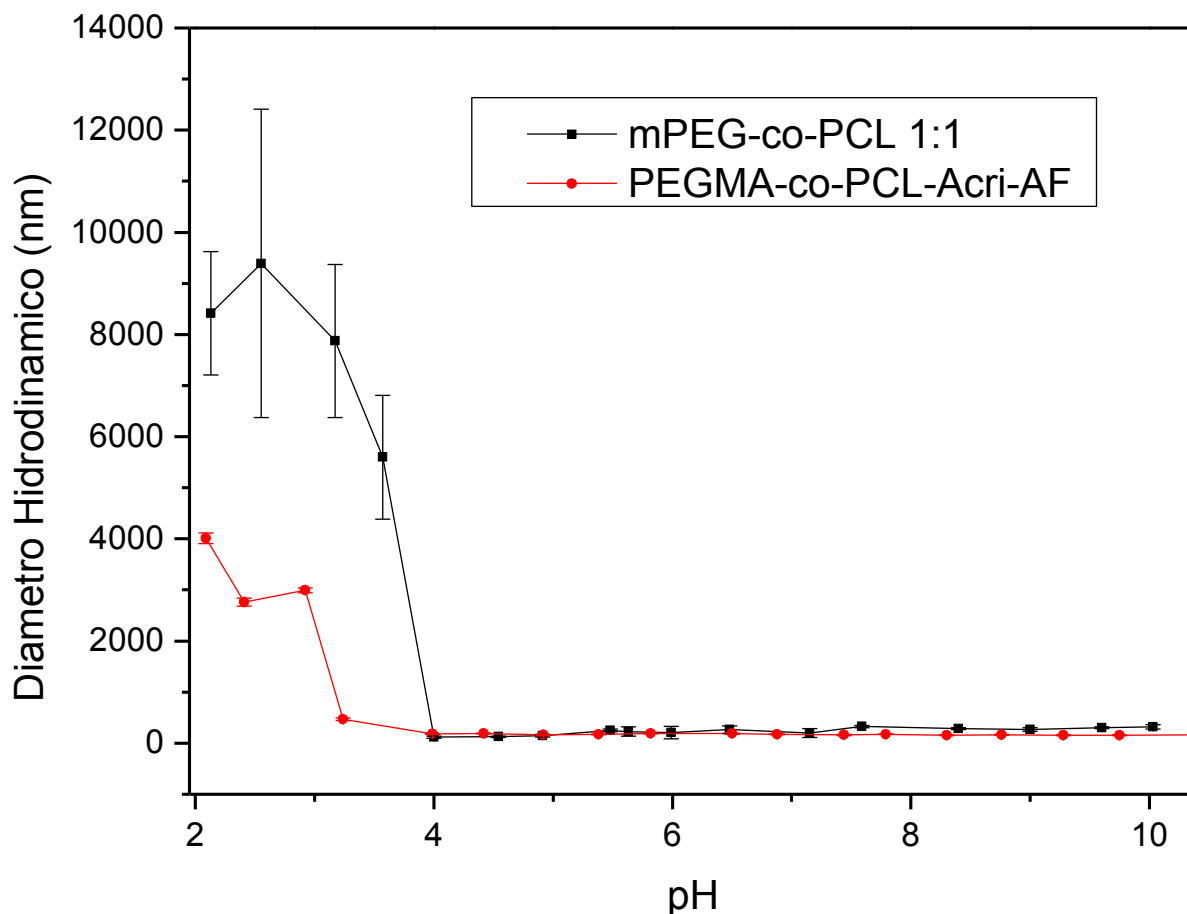
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se no gráfico da **figura 20**, que há diferenças quanto ao comportamento das curvas de potencial Zeta em função do pH para as amostras mPEG-co-PCL e PEGMA-co-PCL-Acri-AF. Verifica-se que a amostra PEGMA-co-PCL-Acri-AF não atinge seu ponto isoelétrico na faixa de pH estudada. A diferença nas curvas demonstra que a superfície das micelas é desigual, portanto houve

modificação da superfície. No entanto, a técnica não permite dizer qual (is) o(s) grupo(s) funcional (is) foi (ram) adicionado(s) à superfície, mas permite dizer qual sua característica ácido-base. Como a curva possui potencial Zeta negativo por toda a faixa de pH, permite afirmar que há o predomínio de grupos funcionais básicos (base de Lewis). A funcionalização da amostra PEGMA-co-PCL-Acri com ácido fólico ocorreu através da condensação entre os grupos ácidos carboxílicos do ácido fólico e os grupos amidas da acrilamida, deixando apenas os grupos amino primário, heterociclos nitrogenados, amino secundário e amida do ácido fólico livres. Estes grupos contem nitrogênio e este possui par de elétrons isolados que atuam com bases de Lewis, conferindo potencial Zeta negativo à amostra.

A estabilidade das micelas frente à variação do pH foi verificada entre os valores de pH 2 e 10 demonstrada na **figura 21**.

**Figura 21** – Diâmetro hidrodinâmico em função da variação dos valores de pH das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.

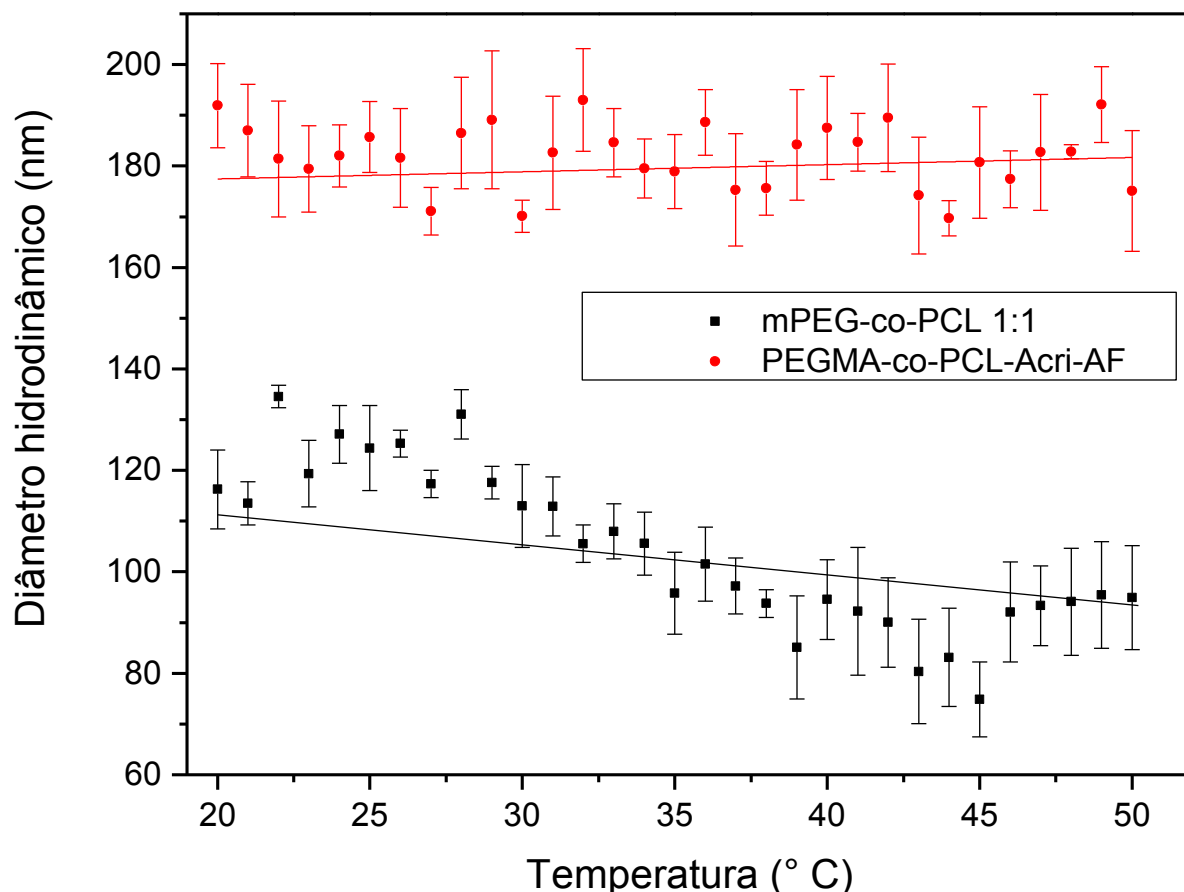


Fonte: Elaborado pelo autor.

As curvas apresentadas na **figura 21** demonstram que tanto as micelas não funcionalizadas (mPEG-co-PCL) e as funcionalizadas com ácido fólico (PEGMA-co-PCL-Acri-AF) sofrem efeitos similares em valores baixos de pH. Isto é observado em valores de pH próximo a 4 para ambas as amostras, no qual as micelas começam a agregar uma vez que os valores do diâmetro hidrodinâmico atingem valores acima de 2  $\mu\text{m}$ .

Comparou-se a estabilidade micelar frente à temperatura das amostras mPEG-co-PCL 1:1 e PEGMA-co-PCL-Acri-AF entre 25° C e 50° C, contendo a faixa de temperatura encontrada no corpo humano, de 36,5° a 37,7° C (38). A **figura 22** abaixo demonstra o comportamento das micelas em função ao aumento da temperatura.

**Figura 22** – Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura das amostras PEGMA-co-PCL-Acri-AF e mPEG-co-PCL 1:1 sintetizadas a 120° C durante 3 horas em atmosfera inerte.



Fonte: Elaborado pelo autor

Por meio do gráfico apresentado na **figura 22**, nota-se certa flutuação das medidas em relação ao diâmetro hidrodinâmico das micelas principalmente na

amostra mPEG-co-PCL 1:1. O comportamento das curvas mostra que, independente da micela estar funcionalizada com ácido fólico ou não, estas não sofrem efeitos de mudanças estruturais, tal como agregação, no aumento da temperatura. Portanto, a modificação da superfície da micela com ácido fólico não permite que o aumento da temperatura atue como estímulo para a liberação do fármaco em meio biológico.

## 5. CONCLUSÃO

Através das técnicas espectroscópicas (espectroscopias de transmitância na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear de próton), foi possível determinar a obtenção dos copolímeros mPEG-co-PCL, PEGMA-co-PCL-Acri e sua funcionalização com ácido fólico, além da obtenção de informações acerca da estrutura química. Para a funcionalização, os espectros de transmitância na região do infravermelho foram fundamentais uma vez que estes permitiram confirmar a formação da ligação imida entre o ácido fólico e o copolímero PEGMA-co-PCL-Acri. Por meio da cromatografia de permeação em gel, determinou-se a massa molecular das amostras sintetizadas, permitindo o uso do valor da massa molecular como resposta da influência da composição, temperatura e tempo de síntese. Destas variáveis, observou-se que a composição apresentou maior significância nos valores de massa molecular obtidos.

Para o copolímero mPEG-co-PCL foi realizado estudos térmicos, inicialmente para as amostras sintetizadas a 120° C durante 3 horas para que fosse determinada outra possível temperatura de síntese e que nesta não ocorresse a degradação do material durante a síntese. A partir disto, definiu-se que a temperatura máxima de síntese seria 180° C desde que fosse um período curto, neste trabalho utilizado o tempo de 3 horas. Através do difratograma de raios X, observou-se que a amostra é semicristalina, característica provinda do segmento PCL do copolímero, este teve seus picos identificados e comparados com a literatura.

A concentração micelar crítica das micelas foram determinadas a partir da tensão interfacial entre a solução (água e copolímero) e ar. A utilização da tensão interfacial se mostrou um diferencial no trabalho uma vez que na literatura, uma vez que a maioria dos artigos utilizados como referência neste trabalho faz uso de métodos comuns (por exemplo: uso de diferentes soluções de copolímeros e moléculas luminescentes atuando como marcadores).



A estabilidade micelar dos copolímeros com e sem funcionalização foram obtidos a partir da variação do diâmetro hidrodinâmico das micelas frente à mudança de pH e temperatura e do potencial zeta em função do pH. Determinou-se que as micelas (com e sem funcionalização): aglomeram em meio ácido, quando os valores de pH estão próximos a 4 e não sofrem efeitos de mudanças estruturais com o aumento da temperatura, dessa forma não permitindo o uso da temperatura como estímulo na liberação do fármaco metotrexato. Quanto ao comportamento do potencial zeta em função do pH, as micelas não funcionalizadas apresentaram ponto isoelétrico em valores de pH próximo a 4. Neste valor de pH, as micelas não apresentaram estabilidade significativa uma vez que a repulsão eletrostática era zero e provocou o agrupamento das micelas, observado nos gráficos de diâmetro hidrodinâmico em função do pH. As micelas funcionalizadas também agregaram em meio ácido, valores de pH entre 3,5 e 4, no entanto a curva no gráfico de potencial zeta em função do pH não permite obter uma explicação plausível uma vez estas não atingem seu ponto isoelétrico (ponto de menor repulsão eletrostática) dentro da faixa de pH estudada.

As micelas mPEG-co-PCL foram aplicadas no estudo de incorporação de metotrexato. Todas as composições apresentaram alta incorporação, sendo a amostra 1:1 com a menor incorporação dentre elas com 88,40 % de eficiência. Os altos valores de incorporação são devidos as fortes interações intermoleculares entre o copolímero e o fármaco.

## 6. TRABALHOS FUTUROS

- Estudo reológico das micelas com e sem funcionalização;
- Determinar a energia livre de superfície dos copolímeros mPEG-co-PCL e PEGMA-co-PCL-Acri-AF;
- Estudo térmico do copolímero funcionalizado com ácido fólico;
- Investigar a estabilidade coloidal das partículas contendo drogas;
- Aplicar estímulos químicos (pH) na liberação de drogas;
- Estudar o mecanismo de liberação.

## REFERÊNCIAS

- 1 LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 198-214, 2013.
- 2 MANADAS, R. et al. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 375-399, 2002.
- 3 MILADI, K. et al. Drug carriers in osteoporosis: preparation, drug encapsulation and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 445, p. 181-195, 2013.
- 4 PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751-760, 2007.
- 5 LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1650-1662, 2008.
- 6 OWEN, S. C. et al. Polymeric micelle stability. **Nano Today**, v. 7, p. 53-65, 2012.
- 7 CUONG, N.V. V. et al. Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG triblock copolymers as carriers of doxorubicin for the treatment of breast cancer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, p. 3694-3702, 2010.
- 8 BAHADORI, F. et al. Synthesis and characterization of biodegradable amphiphilic star and Y-shaped block copolymers as potential carriers for vinorelbine. **Polymers**, v. 6, p. 214-242, 2014.
- 9 SONG, Z. et al. Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 312-321, 2014.
- 10 GONG, C. et al. Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, p. 89-99, 2009.
- 11 AHMED, F.; DISCHER, D. E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 37-53, 2004.
- 12 WEI, X. et al. Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 1-18, 2009.
- 13 DANAFAR, H. et al. Biodegradable mPEG/PCL core-shell micelles: preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 501-510, 2014.

14 LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Review**, v. 38, p. 3484-3504, 2009.

15 GAUCHER, G. et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 169-188, 2005.

16 NEBENDAHL, K. Route of administration. **Laboratory Procedure with Rats**. p. 463-481, 2000.

17 ABRAMOV, E. et al. Cellular mechanism of oral absorption of solidified polymer micelles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, p. 1993-2002, 2015.

18 BERTRAND, N. 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.

19 SEO, D.H. et al. Methotrexate-incorporated polymeric nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 69, p. 157-163, 2009.

20 ZHU, L. et al. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 236-143, 2009.

21 RAICHAUDHURI, A. et al. Plant vacuolar ATP-binding cassette transporters that translocate folates and antifolates in vitro and contribute to antifolate tolerance in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 8449-8460, 2009.

22 CRONSTEIN, B. N. Methotrexate and its mechanism of action. **Arthritis & Rheumatism**, v. 39, p. 1951-1960, 1996.

23 SOUZA, M. A. 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.

24 RUEST, L. et al. S. A convenient synthesis of 3-alkylthiophenes. **Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry**, v. 6, p. 169-174, 1976.

25 MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2004. 269 p. Disponível em: <[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2016.

26 PERKINELMER. **Lambda 465 UV/Vis spectrophotometer**. Waltham, 2016. Disponível em: <<http://www.perkinelmer.com/product/lambda-465-uv-vis-spectrophotometer-n4100030>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

- 27 PERKINELMER. **Lambda™ 265/365/465 UV/Vis Spectrophotometer**. Waltham, c2015. Disponível em: <[http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO\\_LAMBDA\\_265\\_365\\_465\\_012057\\_02.pdf](http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_LAMBDA_265_365_465_012057_02.pdf)>. Acesso em: 25 de nov. 2016.
- 28 FISCHER, L. **Gel filtration chromatography**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1980. 269 p.
- 29 WUNDERLICH, B. **Thermal analysis of polymeric materials**. Berlin: Springer-Verlag, 2005. 894 p.
- 30 TURI, E. A. **Thermal characterization of polymeric materials**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1997. 2420 p.
- 31 ZHOU, S. et al. Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system. **Biomaterials**, v. 24, p. 3563-3570, 2003.
- 32 SHUAI, X. et al. Micellar carriers based on block copolymers of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p. 415-426, 2004.
- 33 BOGDANOV, B. et al. Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymers. **Polymer**, v. 39, p. 1631-1636, 1998.
- 34 KIM, M. S. et al. Preparation and characterization of mPEG–PCL diblock copolymers with thermo-responsive sol-gel-sol phase transition. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 44, p. 5413-5423, 2006.
- 35 SHI, S. et al. Chitosan grafted methoxy poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanosuspension for ocular delivery of hydrophobic diclofenac. **Scientific Reports**, v. 5, 2015. doi:10.1038/srep11337
- 36 SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. 185 p.
- 37 LI, Z.; TAN, B. H. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers: molecular design, self-assembly and biomedical applications. **Materials Science and Engineering C: Materials Biology Applications**, v. 45, p. 620-634, 2014.
- 38 DINARELLO, C. A.; PORAT, R. Cardinal manifestations and presentation of diseases. In: LONGO, D. L. et al. (Ed.). **Harrison's principles of internal medicine**. 19th ed. New York: McGraw-Hill Education, 2015. Part. 2, sect. 2, chap. 23, p. 123-127.