

João Victor Brandt

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímero PCL-co-PEGMA-ácido fólico para liberação controlada de metotrexato.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques.

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

B821n Brandt, João Victor
Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com
copolímero PCL-co-PEGMA-ácido fólico para liberação
controlada de metotrexato / João Victor Brandt. –
Araraquara : [s.n.], 2019
83 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

1. Materiais biomédicos. 2. Tecnologia de liberação
controlada. 3. Nanopartículas. 4. Câncer. 5. Metotrexato.

I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímero PCL-co-PEGMA-ácido fólico para liberação controlada de metotrexato"

AUTOR: JOÃO VICTOR BRANDT

ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES

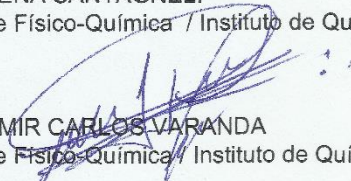
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Dr^a. SILVIA HELENA SANTAGNELI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LAUDEMIR CARLOS VARANDA
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 22 de fevereiro de 2019

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: João Victor Brandt (citações **BRANDT, J. V.**)

Filiação: João Carlos Brandt e Luzia Aparecida Archangelo Brandt.

Nascimento: 06/06/1995 - Araras/SP - Brasil.

Carteira de Identidade: 40.017.370-0 SSP - SP - 01/04/2014.

CPF: 421.645.118-75.

Endereço eletrônico: joao.brandt@gmail.com // joao-brandt@hotmail.com

Endereço profissional

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Instituto de Química - Campus de Araraquara.

Jardim Quitandinha - Araraquara/SP - Brasil.

Rua Professor Francisco Degni, nº 55 - CEP 14800-060

Formação acadêmica/Titulação

2013 – 2016 Bacharelado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química, Campus de Araraquara, São Paulo, Brasil.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques.

Formação complementar

2018 – 2018 Curso de curta duração “10ª Escola de Verão em Medicina – Medicamentos: do alvo para o mercado”. (Carga horária: 50h). Escola de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto/SP, Brasil.

Áreas de atuação

1. Química
2. Físico-Química
3. Química de Interfaces/Físico-Química de Superfícies
4. Nanomateriais
5. Biomateriais

Artigos completos publicados em periódicos

1. BRANDT, J. V.; PIAZZA, R. D.; SANTOS, C. C.; VEGA-CHACÓN, J.; AMANTEA, B. E.; PINTO, G. C.; MAGNANI, M.; PIVA, H. L.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C. Synthesis and colloidal characterization of folic acid-modified PEG-b-PCL Micelles for methotrexate delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 228-234, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.008>
2. LUCENA, G. N.; SANTOS, C. C.; PINTO, G. C.; ROCHA, C. O.; **BRANDT, J. V.**; PAULA, A. V.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C. Magnetic cross-linked enzyme aggregates (MCLEAs) applied to biomass conversion. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 270, p. 58-70, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.11.003>
3. PIAZZA, R. D.; **BRANDT, J. V.**; GOBO, G. G.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; MARQUES, R. F. C.; JAFELICCI JR, M. mPEG-co-PCL nanoparticles: The influence of hydrophobic segment on methotrexate drug delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 555, p. 142-149, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.06.076>

A vida e suas reviravoltas que me fizeram amadurecer.
Aos meus pais pelo incentivo, apoio e amor ao longo da jornada.
Aos meus amigos pela convivência, descontração e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Carlos e Luzia, pelo constante suporte nos momentos mais importantes da minha vida, pela paciência e amor. Muito obrigado;

À minha avó Helena, responsável por me ajudar a espairecer a mente durante os fins de semana e sempre acreditar em mim;

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

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Júnior por seu vasto conhecimento;

Ao Rodolfo D. Piazza e ao Caio C. Santos pela grande amizade e supervisão científica durante a realização deste trabalho – grandes mestres (apesar de doutores!);

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

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

Aos amigos Fred, Biel, Gabi, Élide, Gu, Tofolo, Bru, Jadi, Rose, Corte e Matt.

À CNPq pela bolsa concedida;

Uma gota de tinta caiu sobre o papel e eu a arrastei. Agora, cada ponto da área dentro das paredes é preto ou branco; e nenhum ponto é preto e branco. Isso é claro. O preto está, no entanto, todo em um ponto ou mancha; está dentro dos limites. Existe uma linha de demarcação entre o preto e o branco. Agora eu pergunto sobre os pontos desta linha, eles são pretos ou brancos? Por que um mais que o outro? Eles são (A) ambos pretos e brancos ou (B) nem pretos e nem brancos? Por que A mais que B, ou B mais que A? [...] Isso nos leva a refletir que é como se eles estivessem conectados em uma superfície contínua no qual os pontos são coloridos; tomados isoladamente eles não têm cor e não são nem pretos nem brancos, nenhum deles. [...] A conclusão é que os pontos próximos ao limite são metade pretos e metade brancos. São pontos que devem ser considerados se tentarmos declarar as propriedades em todos os pontos precisos de uma superfície, considerando esses pontos, como devem ser, em sua conexão de continuidade.

Na lógica da quantidade. Charles Sanders Peirce. 1893.

RESUMO

O câncer é responsável por uma alta taxa de mortalidade e é considerado um problema de saúde pública. Entre os vários métodos de tratamento antineoplásico, a quimioterapia é a mais utilizada. A fim de reduzir os efeitos colaterais provocados pela quimioterapia, o uso de plataformas nanométricas de liberação permite uma ação em locais específicos, tornando o tratamento mais eficiente para os pacientes. Diversas nanoplataformas são reportadas na literatura para o tratamento do câncer e dentre estas, as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímeros em bloco possibilitam a interação simultânea com fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. A avaliação das propriedades dessas plataformas possibilita otimizar sua ação no corpo humano, aumentando o tempo de circulação e seu direcionamento para regiões específicas no organismo. A eficiência de incorporação e o perfil de liberação controlada é estritamente dependente do tamanho, morfologia e das interações dos blocos do copolímero. A aplicação dessas nanopartículas é promissora no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Com a redução dos efeitos colaterais, devido ao uso dessas nanoplataformas, permitirá ao paciente um tratamento menos agressivo e mais eficiente, melhorando sua qualidade de vida. Neste trabalho, estudou-se a síntese de uma nanoplataforma híbrida composta de um núcleo inorgânico e uma casca polimérica. O núcleo inorgânico é composto por óxido de ferro (magnetita) e a casca orgânica é composta pelo copolímero em bloco PCL-co-PEGMA modificado com ácido fólico. Espectroscopias na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear permitiram confirmar a obtenção da nanoplataforma conforme mencionado. Foram obtidas partículas com aproximadamente 180 nm estáveis em pH fisiológico, possibilitando sua aplicação em diferentes regiões do corpo humano. A eficiência de incorporação do metotrexato foi de aproximadamente 96%. Os ensaios de liberação do fármaco indicaram que a nanoplataforma é menos ativa em pH próximo a 2 (pH encontrado no fluido gástrico no estômago) enquanto a presença de glutatona reduzida aumenta a liberação de metotrexato, atingindo quase 50% de liberação de metotrexato após 96 horas (4 dias) de análise. A eficiência da nanoplataforma permite identificar sua potencialidade como sistema de liberação controlada.

Palavras chave: Nanopartículas híbridas. Carvão@casca. Liberação controlada. Metotrexato.

ABSTRACT

Cancer is responsible for many fatalities and it's considered a public health problem. Among several methods of antineoplastic treatments, the chemotherapy is the most used. To reduce the side effects caused by chemotherapy, the use of nanometric release platforms allows action in specific sites targets, making the cancer treatment more efficient for patients. Its reported in the literature many kinds of nanoparticles that can be used in cancer treatment, but the block copolymer functionalized magnetic nanoparticles stand out due to their simultaneous interaction with hydrophobic and hydrophilic drugs. The evaluation of the properties of these platforms allows optimizing their action in the human body, enabling more time of circulation and targeting a specific region in the organism. The incorporation efficiency and the controlled release profile is strictly dependent on the size, morphology, and interactions of the copolymer blocks. The application of these nanoplatfroms is promising in the development of drug delivery systems. Because the reduction of side effects, due to the use of these nanoplatfroms, it will allow the patient a less aggressive and more efficient treatment, improving the life's quality. In this work, we studied the synthesis of a hybrid nanoplatfrom composed of an inorganic core and a polymeric shell. The inorganic core is composed of iron oxide (magnetite) and the organic shell is composed of the PCL-co-PEGMA block copolymer modified with folic acid. Infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance allowed the confirmation of the nanoplatfrom synthesis. Particles around 180 nm stable at physiological pH was obtained, allowing its application in different regions of the human body. The incorporation efficiency of methotrexate was approximately 96%. The drug delivery assays indicated that the nanoplatfrom is less active at pH values close to 2 (pH value found in stomach gastric fluid) in the meanwhile the presence of reduced glutathione enhanced the methotrexate release, reaching almost 50% methotrexate liberation after 96 hours (4 days) of analysis. The efficiency of the nanoplatfrom allowed to identify its potential as a controlled drug delivery system.

Key words: Hybrid nanoparticles. Core@Shell. Controlled Release. Methotrexate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema da célula unitária de estrutura do tipo espinélio inverso presente na fase magnetita do óxido de ferro. Adaptado de Kalendová, A (19).	21
Figura 2 -	Resumo esquemático dos mecanismos de transporte. (A) transporte mediado por receptores; (B) transporte mediado por transmissor; (C) transporte paracelular; (D) transporte transcelular e (E) transporte mediado por célula M – fagocitose por células M. Adaptado de Yun, Y (36).	25
Figura 3.A -	Estrutura química da nanopartícula híbrida desenvolvida	29
Figura 3.B -	Estrutura tridimensional da nanopartícula híbrida desenvolvida	29
Figura 4 -	Estruturas moleculares das moléculas ácido fólico e metotrexato.	30
Figura 5 -	Esquema do mecanismo de ação do MTX, mostrando a inibição de reações de transmetilação e da formação de poliaminas pelo metotrexato. Adaptado de Cronstein, B. N (56).	31
Figura 6 -	Rota sintética do copolímero PCL-co-PEGMA e a posterior modificação com ácido 3-mercaptopropiônico, 2-propenamina e ácido fólico.	35
Figura 7 -	Espectro de transmitância na região do infravermelho da amostra PCL-co-PEGMA e suas posteriores modificações.	45
Figura 8 -	Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio das amostras (1) PCL-co-PEGMA, (2) HS-PCL-co-PEGMA, (3) HS-PCL-co-PEGMA-NH ₂ e (4) HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF, respectivamente.	47
Figura 9 -	Curva de calibração para os padrões de PE com diferentes massas moleculares em DMF.	49
Figura 10 -	Cromatograma das amostras PCL-co-PEGMA, HS-PCL-co-PEGMA, HS-PCL-co-PEGMA-NH ₂ e HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF, respectivamente.	50
Figura 11 -	Aspecto visual e magnético da dispersão coloidal das	51

nanopartículas de óxido de ferro em meio aquoso.

- Figura 12 - Difratoograma de raios X da amostra de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (fase magnetita) e do padrão PDF n° 19-629 para comparação. 52
- Figura 13 - Espectros de transmitância na região do infravermelho médio para as amostras de nanopartículas pré e pós-funcionalização com o agente de superfície MPTS. 53
- Figura 14 - Espectros de transmitância na região do infravermelho médio para as amostras NP, NP@MPTS, NP@MPTS@POL, NP@MPTS@POL@AF e HS-PCL-co-PEGMA, nessa ordem. 55
- Figura 15 - Curva TG das amostras de nanopartículas com e sem funcionalização e do copolímero modificado. 58
- Figura 16 - Curva de DSC das amostras de nanopartículas com e sem funcionalização e do copolímero modificado. 59
- Figura 17 - Curva de titulação do potencial zeta (ζ) das amostras de nanopartículas à 25 °C. 60
- Figura 18 - Gráfico da variação do diâmetro hidrodinâmico em função da mudança do valor de pH da dispersão à 25 °C. 62
- Figura 19 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das amostras de nanopartículas à 25 °C e pH 7,4. 64
- Figura 20 - Espectro de absorvância do fármaco metotrexato na região do UV-Vis. 67
- Figura 21.A - Curvas analíticas para o metotrexato nos comprimentos de onda 258, 303 e 371 nm. 68
- Figura 21.B - Curva analítica para o metotrexato no comprimento de onda 303 nm. 68
- Figura 22 - Perfil de liberação de metotrexato das amostras de nanopartículas na presença e ausência de glutatona reduzida (GSH) em tampão fosfato (pH 7,4) e simulado de fluido gástrico (pH 2). 71
- Figura 23 - Curva bi-logarítmica da fração de metotrexato liberado em função do tempo 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões comerciais de PE utilizados no preparo da curva de calibração do método de cromatografia de permeação em gel (GPC).	48
Tabela 2 - Distribuição das massas molares das amostras do copolímero e suas modificações obtida por GPC.	50
Tabela 3 - Influência da variação na proporção em massa fármaco:matriz na eficiência de incorporação do metotrexato.	69
Tabela 4 - Parâmetros obtidos da curva cinética de liberação de metotrexato das nanopartículas híbridas.	72

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	38
Equação 2	38
Equação 3	39
Equação 4	41
Equação 5	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ζ	Potencial Zeta
ϵ -CL	ϵ -Caprolactona
AF	Ácido Fólico
CDCL ₃	Clorofórmio Deuterado
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DHFR	Dihidrofolato Redutase
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Cancer
Mn	Massa molecular média com base em número
Mp	Pico da massa molecular
Mw	Massa molecular média com base em massa
MPTS	(3-mercaptopropil)triétoxissilano
MTX	Metotrexato
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato 0,01 mol L ⁻¹ pH 7,4

PCL	Poli(caprolactona)
PdI	Índice de Poldispersão
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEGMA	Poli(etilenoglicol) metacrilato
PCL-co-PEGMA	Poli(caprolactona)- <i>copolímero</i> -Poli(etilenoglicol metacrilato)
HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF	Poli(caprolactona)- <i>copolímero</i> -poli(etilenoglicol) modificado com ácido 3-mercaptopropiônico, 2-propenammina e ácido fólico
PE	Poli(estireno)
PTFE	Poli(tetrafluoretileno)
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido Ribonucleico
Sn(Oct) ₂	2-etilhexanoato de estanho II (comercial Octanoato de estanho)
τ	Relaxação Magnética
TG	Termogravimetria
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometro
μL	Microlitro
Ω	Ohms
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
cm	Centímetro
g	Grama
h	Hora
Hz	Hertz
L	Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão
s	Segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	20
1.2. POLÍMEROS EM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	23
1.3. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE NANOPLATAFOMAS NO ORGANISMO	24
1.4. ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPLATAFORMAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA	27
1.5. METOTREXATO APLICADO AO TRATAMENTO DE CÂNCER	30
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1. REAGENTES UTILIZADOS	34
3.2. ROTA SINTÉTICA EMPREGADA	34
3.2.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com (3-mercaptopropil)triétoxissilano (MPTS)	34
3.2.2. Síntese do copolímero PCL-co-PEGMA-AF contendo grupo tiol livre terminal	36
3.2.3. Obtenção do sistema caroço-casca: nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímero PCL-co-PEGMA	37
3.3. ESTUDO DE INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO METOTREXATO	37
3.4. CARACTERIZAÇÃO	40
3.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho médio (FTIR)	40
3.4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ¹ H)	40
3.4.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	40
3.4.4. Difração de Raios X (DRX)	41
3.4.5. Potencial Zeta (ζ)	41
3.4.6. Diâmetro Hidrodinâmico (D_h)	41
3.4.7. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	42
3.4.8. Termogravimetria (TG)	42
3.4.9. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. COPOLÍMERO PCL-co-PEGMA-AF	44
4.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO (FASE MAGNETITA) FUNCIONALIZADAS COM MPTS	51
4.3. SÍNTESE DO SISTEMA CAROÇO-CASCA: NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS COM COPOLÍMERO PCL-co-PEGMA CONTENDO LIGAÇÃO DISSULFETO	55
4.4. CARACTERIZAÇÃO COLOIDAL	60
4.5. EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO E PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO MTX	67
5. CONCLUSÕES	73
6. PERSPECTIVAS	74
7. REFERÊNCIAS	75

1. Introdução

O câncer é uma doença responsável por uma alta taxa de mortalidade, independentemente da idade e sexo do indivíduo (1). Segundo o documento *World Cancer Report* da Agência Internacional para Pesquisa sobre Cancer (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se o surgimento de 20 milhões de novos casos até 2025, sendo 80% em países em desenvolvimento (2). No Brasil, durante o biênio 2016-2017, estimou-se a ocorrência de 600 mil novos casos (2).

Existem diversos métodos de tratamento do câncer, tais como: radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e cirurgia (3). Dentre esses, a quimioterapia antineoplásica tem sido a abordagem escolhida para o tratamento de tumores em casos avançados (4). No entanto, esta abordagem apresenta certa citotoxicidade e possibilita resistência ao tratamento (3,5). Uma das causas da citotoxicidade é proveniente da não-seletividade dos fármacos utilizados no tratamento, o qual muitas vezes não consegue distinguir entre células saudáveis para células tumorais, acarretando a morte de ambos os tipos de células (como exemplo desse tipo de fármaco utilizados temos a *cis-platina*) (6).

Uma forma de contornar essa barreira é a utilização de plataformas de liberação (7,8). Essas plataformas permitem a incorporação de fármacos pouco solúveis e possibilita sua liberação em locais específicos no organismo. Esses carreadores também possibilitam a proteção de moléculas bioativas, o aumento da biodisponibilidade na corrente sanguínea e melhora a distribuição nos tecidos (9). Essas características dos carreadores minimizam os efeitos colaterais dos fármacos.

O emprego de plataformas de liberação em terapias, devido suas dimensões, depende principalmente das propriedades físico-químicas da superfície do carreador (10). Dessa forma, a superfície do carreador pode ser funcionalizada proporcionando o aumento da biodisponibilidade de várias moléculas ativas (11), protegendo a molécula ativa contra inativação enzimática (12), direcionamento para regiões específicas na qual a ação terapêutica é desejada e aumenta a eficiência de absorção pelos diferentes tecidos (13). Os carreadores podem ser sintetizados a partir de matrizes inorgânicas, orgânicas ou materiais híbridos, e ainda apresentam ampla variedade de morfologia e tamanho (14). As vantagens no uso de plataformas de liberação em escala nanométrica residem na possibilidade de que **(i)** esses 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 em alvos desejados, **(iii)** aumentam a eficácia do tratamento e **(iv)** reduzem efeitos colaterais nos pacientes (15).

1.1. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas (NP) compõe uma vasta gama de nanomateriais e, por definição, possuem uma ou mais dimensões físicas entre 1 e 100 nm (16). Dentre os diversos tipos de nanopartículas magnéticas, as que mais se destacam em aplicações biomédicas (diagnóstico, imageamento por ressonância magnética e liberação controlada de fármaco) são as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, especificamente a fase magnetita (Fe_3O_4), por ser relativamente fácil de ser sintetizada, biocompatível e responde à influência de um campo magnético externo (17,18).

A propriedade magnética da magnetita surge em decorrência da sua estrutura cristalina e, conseqüentemente, a sobreposição das funções de onda dos orbitais dos átomos de oxigênio e ferro (+2 e +3) presentes. Possui uma estrutura do tipo espinélio invertido caracterizada pelo empacotamento cúbico de face centrada, contendo sítios tetraédricos e octaédricos. O sítio tetraédrico pode ser representado por um cátion metálico como o centro do tetraedro (ocupado exclusivamente por íons de Fe^{3+}) e oxigênios ocupando seus vértices, enquanto o sítio octaédrico também possui em seu centro um cátion metálico (ocupado tanto por íons Fe^{+2} quanto íons Fe^{+3}) e os oxigênios ocupando os vértices do octaedro (19). A **Figura 1** apresenta a imagem da estrutura cristalina da fase magnetita a fim de facilitar a visualização tridimensional do espinélio invertido e a localização dos átomos.

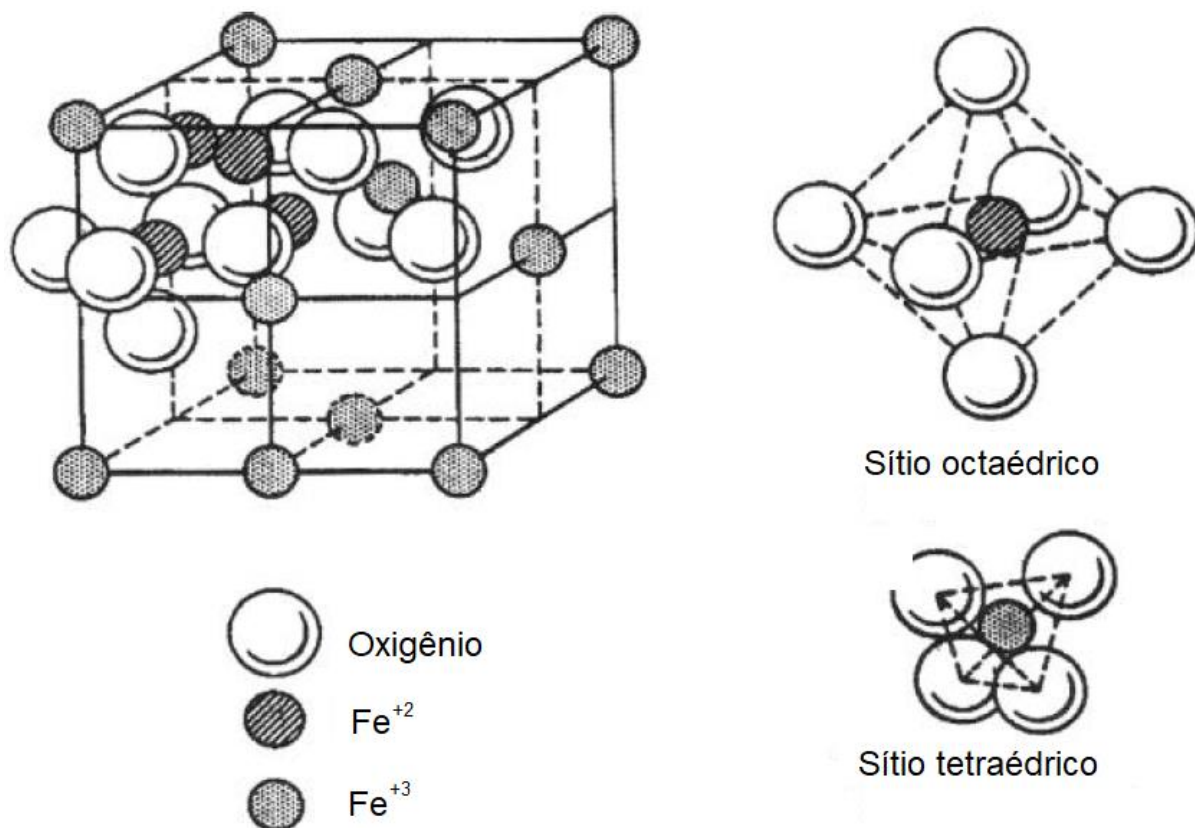


Figura 1 - Esquema da célula unitária de estrutura do tipo espinélio inverso presente na fase magnetita do óxido de ferro. Adaptado de Kalendová, A (19).

Existem diversos métodos que podem ser empregados na síntese das nanopartículas, tais como: microemulsão água em óleo (20), sonoquímico (21), sol-gel (22), coprecipitação (23) etc. Destaca-se o método da coprecipitação devido as suas inúmeras vantagens: homogeneidade química, condições ambientes de síntese, baixo custo e possibilita produção em grande escala (23).

A propriedade magnética dessas nanopartículas possibilita sua utilização como agentes de contrastes no corpo humano (24). Na investigação clínica e na ressonância magnética, os átomos de hidrogênio são mais usados para gerar um sinal de resposta na realização do exame devido sua abundância no corpo humano e outros organismos biológicos, particularmente nas moléculas de água. Dessa forma, o exame de ressonância magnética mapeia essencialmente a localização da água no corpo. Inicialmente, a região do corpo de interesse é submetida à um campo magnético externo. Este campo orienta o spin nuclear dos átomos de hidrogênio em uma direção específica e, posteriormente, incide um pulso de radiofrequência que excita a transição nuclear do spin. Ao retornar ao estado inicial (de repouso), o spin emite uma

radiação característica durante um processo chamado relaxação magnética (τ). As nanopartículas alteram o processo de relaxação e, dessa forma, permite mapear sua presença em regiões específicas do corpo (16,25).

No entanto, as nanopartículas de magnetita possuem baixa estabilidade química e coloidal. A atmosfera ambiente promove a oxidação de íons Fe^{+2} em Fe^{+3} presentes na estrutura cristalina através da reação de oxirredução com o oxigênio presente. Dessa forma, há a mudança de fase no óxido de ferro, da fase magnetita (Fe_3O_4) para a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que possui menor caráter magnético. O material na escala nanométrica apresenta área de superfície maior quando comparado com o mesmo material no seu estado macroscópico. Um problema a ser superado envolvendo as nanopartículas magnéticas de magnetita diz respeito à agregação, pois a elevada razão área/volume induz a agregação como forma de reduzir sua energia de superfície. Portanto, revestir as nanopartículas (funcionalização) previne a oxidação das nanopartículas e evita a agregação das mesmas, sendo crucial para a utilização deste material em aplicações biomédicas.

1.2. Polímeros em liberação controlada de fármacos.

É crescente o número de publicações científicas envolvendo o uso de polímeros como carreadores em liberação controlada. Esses se apresentam nas formas mais variadas em aplicações biomédicas (26). Uma de suas formas é a união em blocos funcionalizadas sobre nanopartículas de óxido de ferro (27). Copolímeros apresentam vantagens sobre as demais estruturas poliméricas uma vez que adquirem propriedades distintas como, por exemplo, a característica anfifílica que permite que interajam com moléculas polares e apolares (28).

Dentre os sistemas estudados encontram-se o polímero em blocos constituído por dois poliésteres, a poli(caprolactona) (PCL) e o poli(etilenoglicol metacrilato) (PEGMA) (29). A PCL é biocompatível e biodegradável, o principal requisito como plataforma de liberação. A biodegradação da PCL no organismo não ocorre por meio de enzimas, mas por via hidrolítica, aumentando o tempo de circulação no organismo e possibilitando o uso deste material em sistemas de liberação controlada (30). Existem dois métodos de preparar esse composto: a condensação de ácido 6-hidróxiexanóico e a polimerização de abertura de anel da ϵ -caprolactona, sendo este último baseado em quatro principais mecanismos (31). Dentre os quatro mecanismos, a polimerização por coordenação-inserção é a mais comumente utilizada, com o uso de um catalisador eficiente e disponível comercialmente que apresenta um metal (estanho – 2-etilhexanoato de estanho II, abreviado como octanoato de estanho $\text{Sn}(\text{Oct})_2$) em sua composição (32).

Semelhante a PCL, o PEGMA também é biocompatível e biodegradável, tornando-o candidato promissor a ser empregado em nanocarreadores. Além de biocompatível, o PEGMA apresenta baixa citotoxicidade e alta solubilidade em água, o que o torna um material amplamente utilizado em aplicações biomédicas. Segmentos de PEGMA na superfície de carreadores apresentam a característica de reduzirem a adesão de proteínas plasmáticas (33), aumentando o tempo de circulação dos carreadores no organismo.

1.3. Mecanismos de transporte de nanoplatafomas no organismo

A administração de fármacos via oral é o modo mais conveniente e o mais aceitável pelos pacientes, uma vez que é um método indolor e de fácil administração (34). No entanto, a obtenção de fármacos para uso oral apresenta diversos obstáculos. Estas barreiras são provenientes tanto do fármaco quanto do organismo. Quanto ao fármaco, está relacionada a baixa solubilidade em meio aquoso, ocasionando baixa dissolução e conseqüentemente, biodisponibilidade e eficiência reduzidas (35). Quanto ao organismo, há as condições extremas de pH e a alta atividade enzimática no sistema gastrointestinal que promovem a degradação dos fármacos (34). Para manter a atividade biológica do fármaco a fim de aumentar a biodisponibilidade, acarretando maior eficiência, faz-se uso de plataformas de liberação, tais como nanopartículas. Portanto, é necessário a caracterização da plataforma utilizada já que a absorção pelos órgãos e tecidos é altamente dependente do tamanho da partícula, potencial zeta e tipo de revestimento – hidrofobicidade (35).

A absorção intestinal de nanopartículas ocorre através da incorporação intercelular no epitélio intestinal e no tecido linfático (36,37). A **Figura 2** apresenta as principais rotas de absorção de sistemas nanoparticulados através da membrana celular (35–37). As rotas são distintas entre si e culminam na transferência da nanopartícula para a circulação sistêmica, com exceção da rota com a presença da célula M: **(a)** uso de carreadores funcionalizados os quais são transportados para o interior da célula através de receptores; **(b)** ocorre o transporte dos carreadores através de transportadores; **(c)** a internalização dos carreadores através do transporte paracelular que ocorre entre as células; **(d)** a absorção pode ocorrer por transporte transcelular, onde a superfície da célula forma invaginações que englobam os carreadores; **(e)** fagocitose através de células M (36). O uso de carreadores funcionalizados permite maior seletividade durante o tratamento neoplásico.

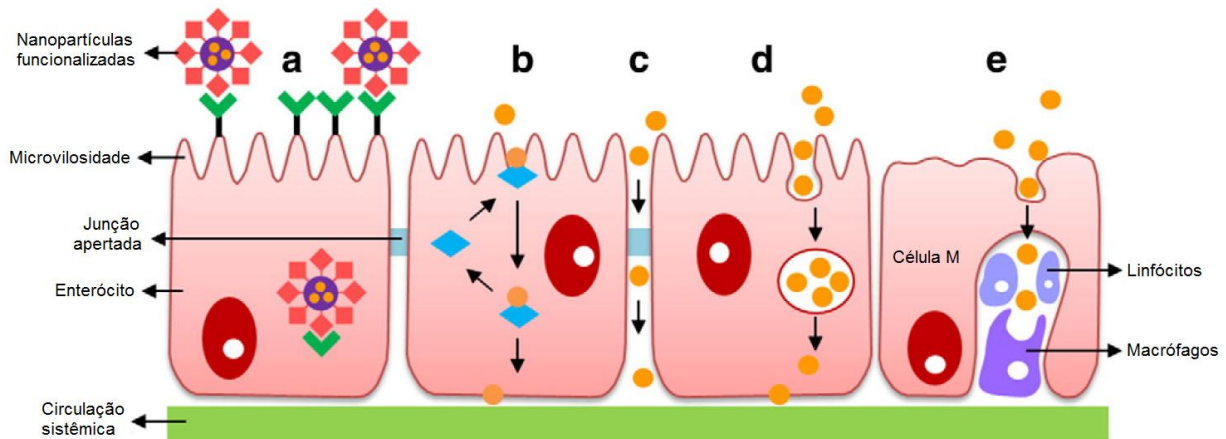


Figura 2 - Resumo esquemático dos mecanismos de transporte. (A) transporte mediado por receptores; (B) transporte mediado por transmissor; (C) transporte paracelular; (D) transporte transcelular e (E) transporte mediado por célula M – fagocitose por células M. Adaptado de Yun, Y (36).

Após o sistema nanoparticulado atingir o sistema circulatório através da mucosa intestinal, outras barreiras devem ser superadas a fim de tornar o carreador eficiente. Ao atingir a corrente sanguínea, o carreador é bombeado pelo coração para o pulmão. Os menores vasos sanguíneos do corpo se localizam nos capilares presentes no pulmão e estes possuem diâmetro compreendido entre 2 e 13 μm , formando a primeira barreira dimensional à passagem de partículas. Devido a deformações dos vasos, partículas menores que 3 μm retornam à circulação (9). Após retornarem ao coração, as partículas são bombeadas aos demais órgãos e, portanto, novos obstáculos. As partículas passam por processos semelhantes àquele existente na membrana intestinal para que possam adentrar nos órgãos. Há uma seleção no diâmetro das partículas a serem absorvidas baseado no tipo de órgão, por exemplo: os rins restringem a entrada de partículas superiores a 60-80 nm, enquanto o fígado e o baço são capazes de filtrar partículas compreendidas entre 100-150 nm e 200 nm, respectivamente, de acordo com a espécie animal em questão. Além disso, há também o processo de fagocitose no qual as partículas, identificadas como corpos estranhos, são englobadas e digeridas pelos fagócitos (tipo de glóbulos brancos oriundos da medula óssea e presentes no sistema circulatório e linfático). A fagocitose consegue eliminar corpos compreendidos entre 100 e 200 nm de diâmetro (9,38,39). Outro fator que culmina na redução do número de partículas que atingem um determinado órgão é sua estabilidade coloidal. Sistemas instáveis tendem a aglomerar

a fim de reduzir a energia de superfície existente. Dessa forma, esses aglomerados de partículas são eliminados pelas barreiras mencionadas anteriormente. A compreensão dos sistemas biológicos permite a obtenção das partículas que superem as barreiras naturais impostas pelo corpo, otimizando a ação terapêutica do tratamento.

1.4. Estratégias de funcionalização de nanoplataformas para liberação controlada

Para a liberação controlada do fármaco, existem dois métodos distintos: o método passivo e o ativo (40). Quando um tumor sólido atinge um certo tamanho, o sistema vascular ao redor não é capaz de suprir o oxigênio necessário para sua proliferação. Conseqüentemente as células começam a se decompor, provocando o desbalanço de fatores proangiogênicos e antiangiogênicos que resulta no surgimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura circundante (41). Este processo conhecido como angiogênese, promove o rápido desenvolvimento de vasos sanguíneos irregulares que levam a formação de fenestrações responsáveis pela permeação de carreadores no interior do tumor (42). Devido ao sistema linfático defeituoso nesta região, a drenagem contínua é minimizada, possibilitando a existência de um ambiente que 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 (42). Em contraste ao método passivo, na liberação controlada ativa emprega-se ligantes específicos na superfície do carreador que permitem intensificar a absorção do carreador pela célula alvo (40). A presença do ligante é identificada por receptores específicos na superfície de células em órgãos debilitados, tecidos ou células (43). Os ligantes utilizados para reconhecimento podem ser anticorpos, proteínas, açúcares, ácidos nucléicos e vitaminas (40). Dentre os possíveis ligantes que podem ser empregados, as vitaminas apresentam a vantagem por serem indispensáveis uma vez que são necessárias para a sobrevivências das células (44). O ácido fólico é uma vitamina essencial para a divisão celular, e, portanto, se faz particularmente necessário para o crescimento do tumor. Logo, as células onde se localiza o tumor, tendem a superexpressarem receptores folato em sua superfície, a fim de manter o processo multiplicativo. Assim, carreadores funcionalizados com ácido fólico apresentam a vantagem de possuir aplicações para diversos tipos de tumores (44). A seletividade da nanoplataforma modificada com ácido fólico possibilita a atuação como um “cavalo de Tróia”, uma vez que a célula internaliza o nanossistema sem saber que o mesmo carrega em seu interior o medicamento para o tratamento cancerígeno.

Em adição ao uso do ligante ácido fólico como direcionador através do corpo humano, há a aplicação de estímulos variados que podem ser utilizados como formas

de intensificar a eficiência da liberação controlada (45). As formas mais comuns de estímulos são: degradação ativada por pH, liberação ativada por redução química, termossensibilidade e resposta à glicose (46). O copolímero PCL-co-PEGMA pode ser estimulado através da mudança nos valores de pH. Quando em valores de pH menores que 7 (solução acidificada), ocorre a degradação hidrolítica, aumentando a liberação do fármaco incorporado (47). Outro tipo de estímulo que ao ser incorporado ao sistema que enriquece sua versatilidade é a degradação por redução (48). Mais especificamente o emprego de ligações dissulfeto entre a união dos blocos que compõe o copolímero (49,50). Estas ligações são caracterizadas por serem prontamente e rapidamente reversíveis, possuindo um papel importante na manutenção das funções biológicas em células vivas (48). Diversos fatores no corpo podem ser utilizados para estimular o rompimento desta ligação, sendo alguns deles: **(i)** glutathiona reduzida (GSH) encontrada nas mitocôndrias, citoplasma, núcleo e no espaço extra celular (48); **(ii)** NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) presente em maior concentração no citoplasma (51); **(iii)** ácido ascórbico (vitamina C) atua como antioxidante natural na redução das ligações dissulfeto (52) e **(iv)** região no corpo com valores baixos de pH, geralmente em regiões periféricas de onde se localiza o tumor (45).

O interior celular possui caráter redutor devido, principalmente, ao elevado nível de GSH presente nas mitocôndrias, citoplasma, núcleo e no espaço extracelular, sendo rapidamente degradada através de enzimas presentes no plasma humano. Estudos apontam para maiores níveis de GSH em células tumorais quando comparadas aos níveis apresentados por células saudáveis. Logo, a presença de grupos químicos susceptíveis às reações de oxirredução com a GSH, especificamente ligações dissulfeto, tornou possível desenvolver novas nanoplataformas de liberação controlada (48). Ao reagir com a enzima, a ligação dissulfeto é rompida em dois grupos terminais sulfidril, enquanto a GSH é oxidada a GSSG.

A união entre os componentes (nanopartícula magnética, ácido fólico e a ligação dissulfeto) traz diversas vantagens à nanoplataforma sintetizada. O ácido fólico possibilitando o direcionamento da mesma a regiões específicas do corpo humano, no qual há o desenvolvimento tumoral. Em segundo plano, permite que a plataforma atue como um “cavalo de Tróia”, interagindo com os receptores folato na superfície das células, facilitando o processo de endocitose nas células. As nanopartículas magnética confirmo o acesso da nanoplataforma ao local do câncer,

por meio do imageamento por ressonância magnética. A ligação dissulfeto contribuiu com a intensificação da liberação do fármaco ao ser rompida pela glutatona reduzida presente no interior das células. Cada componente contribuiu para a obtenção de uma nanoplataforma que atendessem os variados requisitos para que o transporte do fármaco fosse realizado de forma eficiente.

A estrutura química da nanoplataforma híbrida (NP@MPTS@HS-PCL-co-PEGMA-NH@Ácido Fólico) sintetizada no projeto é apresentada na **Figura 3.A** enquanto a estrutura tridimensional é mostrada na **Figura 3.B**.

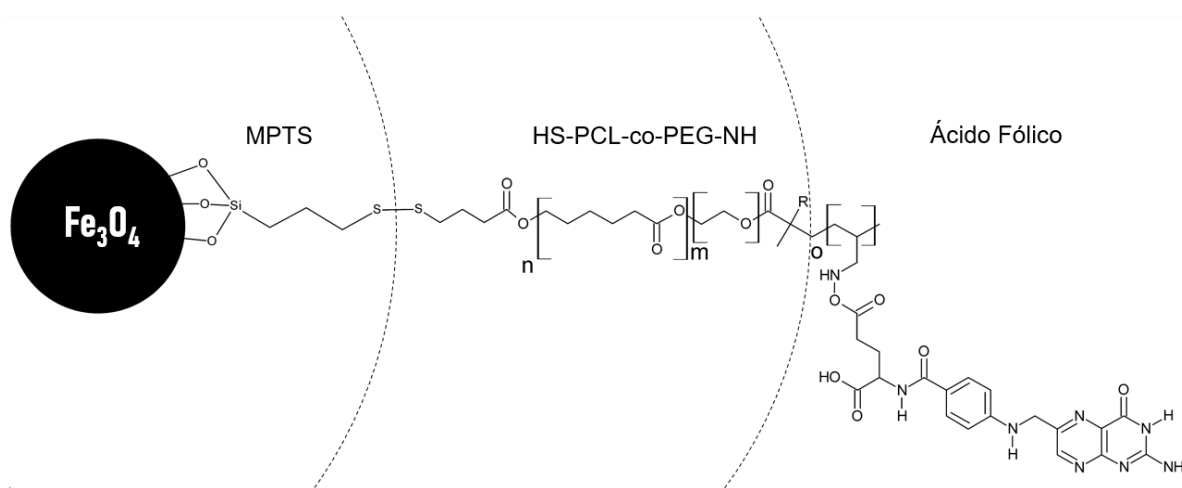


Figura 3.A - Estrutura química da nanopartícula híbrida desenvolvida.

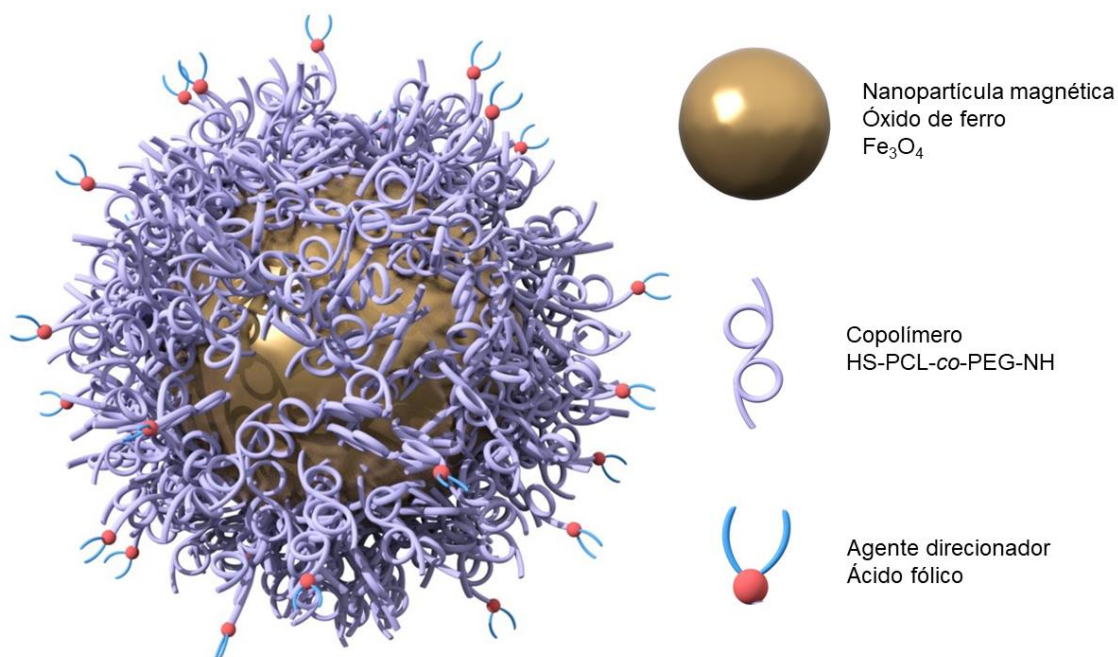


Figura 3.B - Estrutura tridimensional da nanopartícula híbrida desenvolvida.

1.5. Metotrexato aplicado ao tratamento de câncer

Metotrexato (MTX) é amplamente utilizado no tratamento de doenças malignas, incluindo leucemia linfoblástica aguda em crianças, osteoartrite, câncer de cabeça e pescoço, câncer do pulmão, câncer de mama, psoríase entre outros (53). Devido sua similaridade à molécula de ácido fólico, o MTX possui propriedades antimetabólicas e antifolato (54). As estruturas das moléculas ácido fólico e MTX são apresentadas na **Figura 4**.

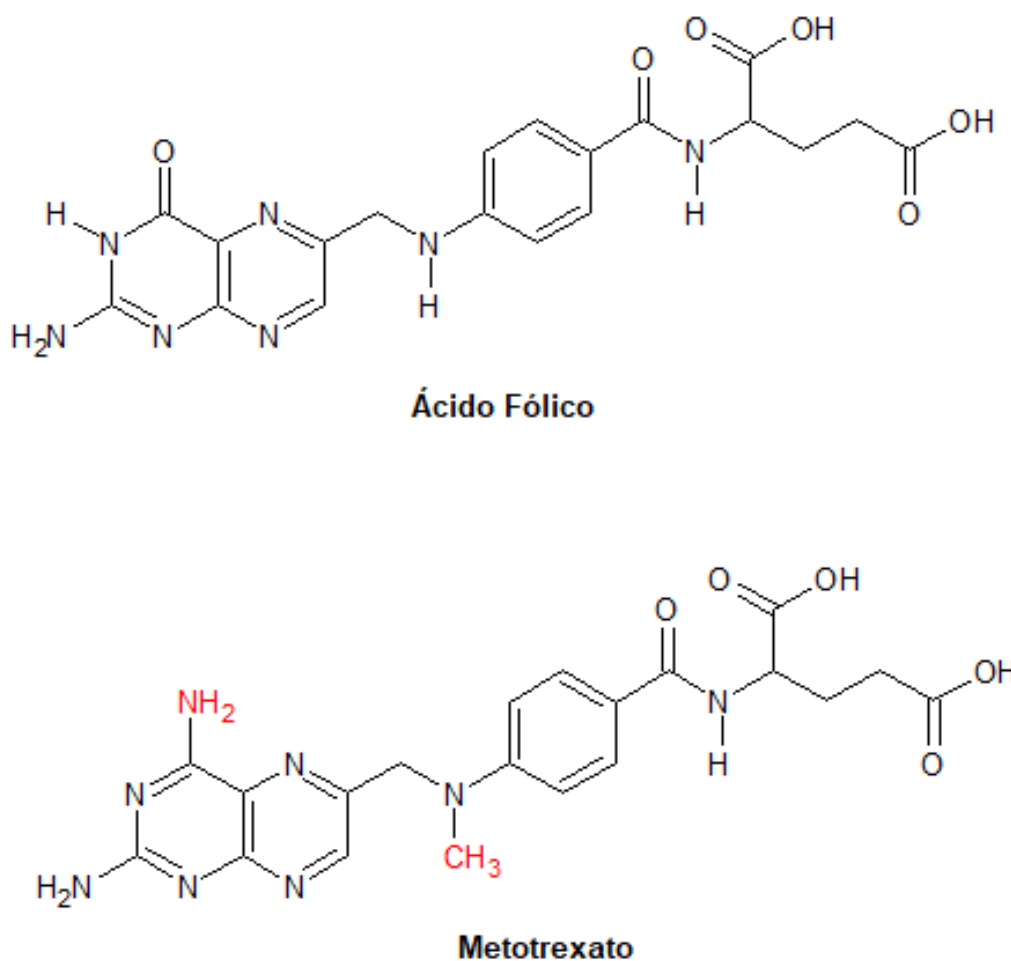
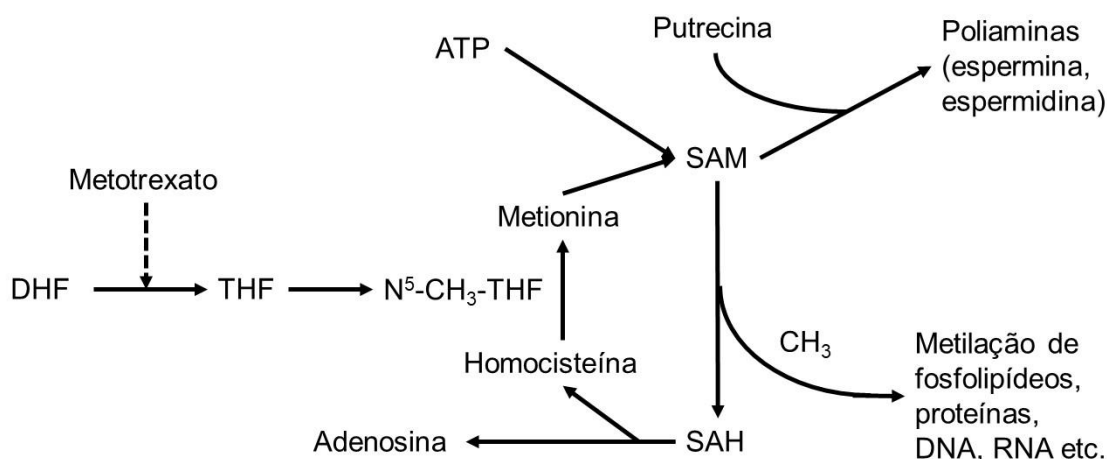


Figura 4 - Estruturas moleculares das moléculas ácido fólico e metotrexato.

As neoplasias são caracterizadas pelo crescimento descontrolado das células. A multiplicação dessas células demanda maior quantidade de nutrientes do que uma célula sadia a fim de manter a reprodução celular. Logo, estas células tendem a expressarem um aumento no número de receptores desses nutrientes em sua superfície. As vitaminas fazem parte dos nutrientes necessários e especificamente o

ácido fólico (vitamina B9) é essencial na manutenção da proliferação celular. Dessa forma, a funcionalização das nanoplateformas com ácido fólico possibilitará o direcionamento das mesmas para regiões do corpo em que há o desenvolvimento do câncer enquanto a presença do MTX no interior da nanoplateforma irá atuar na inibição do metabolismo após o processo de internalização, tornando a plataforma em um “cavalo de Tróia”.

O mecanismo de ação do MTX, apresentado na **Figura 5**, é baseado na inibição do metabolismo do ácido fólico através da competição irreversível aos sítios ativos da dihidrofolato redutase (DHFR) (55). Esta enzima catalisa a conversão do dihidrofolato em tetrahydrofolato (formas reduzidas do ácido fólico) e o MTX impede esta etapa (56). Com esta interrupção, não há as reações de transmetilação nem a formação de poliaminas. As reações de transmetilação são necessárias na síntese das bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas que originariam o DNA e o RNA. Portanto, MTX interfere na multiplicação de células, principalmente as que possuem altas taxas de multiplicação, tais como células cancerosas, células de medula óssea, pele, entre outras (56).



DHF = Dihidrofolato; **THF** = Tetrahydrofolato; **N⁵-CH₃-THF** = N⁵-metil-tetrahydrofolato; **ATP** = Adenosina tri-fosfato; **SAM** = S-Adenosil-metionina; **SAH** = S-Adenosil-homocisteína.

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação do MTX, mostrando a inibição de reações de transmetilação e da formação de poliaminas pelo metotrexato. Adaptado de Cronstein, B. N (56).

Contudo, o uso de doses elevadas de MTX empregadas em quimioterapias e se exposto por períodos longos no corpo humano levam à efeitos colaterais severos

podendo causar desde lesão renal aguda até falência de órgãos em casos extremos (57). Dessa forma, a utilização de um dispositivo de liberação controlada de fármacos reduzirá os efeitos colaterais e permitirá a aplicação de MTX em tratamentos anti-neoplásicos.

2. Objetivos

– Obtenção de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímeros em bloco PCL-co-PEGMA-ácido fólico contendo ligação dissulfeto para verificação da eficiência de incorporação e liberação do fármaco metotrexato para tratamento de câncer.

2.1. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas, especificamente óxido de ferro (fase magnetita), funcionalizadas com copolímero em bloco poli(caprolactona)-co-poli(etilenoglicol metacrilato)-ácido fólico (PCL-co-PEGMA-ácido fólico) contendo ligação dissulfeto na estrutura.
- Caracterizar o copolímero em bloco por FTIR, RMN ¹H e GPC.
- Avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas funcionalizadas em meio aquoso.
- Estudar a eficiência de incorporação e o perfil de liberação de metotrexato em meio aquoso;
- Estudar a influência dos estímulos pH e glutatona reduzida no perfil de liberação do metotrexato;

3. Parte experimental.

3.1. Reagentes utilizados.

Todos os reagentes utilizados na síntese e caracterização das amostras apresentam pureza analítica e são provenientes da Sigma-Aldrich. Para as sínteses que necessitaram de atmosfera inerte foi utilizado gás argônio (Ar) comercial. Não houve tratamento prévio dos reagentes adquiridos.

3.2. Rota sintética empregada.

Todas as sínteses foram realizadas em triplicata para garantir a reprodutibilidade das reações.

3.2.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com (3-mercaptopropil)triétoxisilano (MPTS).

As nanopartículas foram sintetizadas a partir do método desenvolvido por Massart (58). A síntese consiste da coprecipitação de sais cloretos de ferro(II) e (III) na presença de hidróxido de sódio. Em um béquer de poli(tetrafluoretileno) (PTFE – teflon), foram solubilizadas aproximadamente 0,01 mol de cloreto de ferro(II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) e 0,02 mol de cloreto de ferro(III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) em 250,0 mL de água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 M Ω .cm à 25 °C). Adicionou-se 10 μL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e, em seguida, 500,0 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,5 mol L⁻¹. A reação ocorreu à temperatura ambiente durante 1 hora em atmosfera inerte. A dispersão obtida de coloração preta passou por tratamento térmico durante 16 horas a 80° C em balão de síntese de vidro, também em atmosfera inerte. Retirou-se uma alíquota da dispersão após o tratamento térmico para caracterizações e deu-se continuidade para a etapa de funcionalização com (3-mercaptopropil)triétoxisilano (MPTS). A funcionalização das nanopartículas com MPTS ocorreu de acordo com a síntese proposta por Kraus e colaboradores (59). Adicionou-se 0,5 g de nanopartículas e 50,0 mL de água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 M Ω .cm à 25 °C) a um balão de fundo redondo. Aqueceu-

se a dispersão até 90° C, adicionou-se 1×10^{-3} mol de MPTS e deixou reagir durante 3 horas em atmosfera inerte. Por fim, lavou-se a dispersão cinco vezes com água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 M Ω .cm à 25 °C) seguido de separação magnética, a fim de retirar resíduos de síntese.

A **Figura 6** apresenta a rota sintética empregada na modificação do copolímero. Detalhes das reações empregadas são abordados no tópico **3.2.2** deste trabalho.

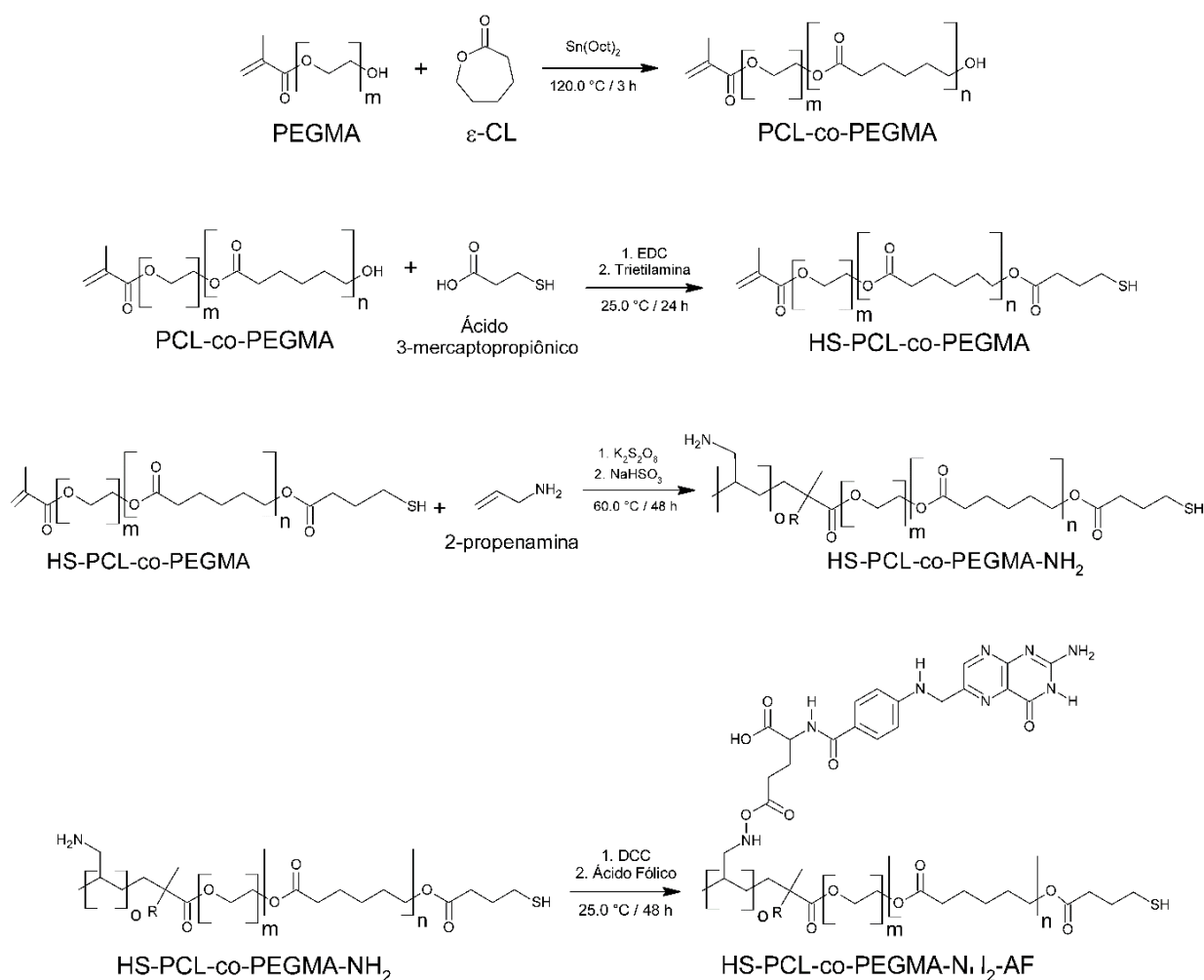


Figura 6 - Rota sintética do copolímero PCL-co-PEGMA e a posterior modificação com ácido 3-mercaptopropiônico, 2-propenamina e ácido fólico.

3.2.2. Síntese do copolímero PCL-co-PEGMA-AF contendo grupo tiol livre terminal.

O copolímero foi sintetizado a partir da reação de polimerização por abertura de anel utilizando catalisador a base de estanho (60). Em um balão de fundo redondo foram adicionados os seguintes componentes: 0,01 mol de ϵ -caprolactona (monômero), $3,25 \times 10^{-3}$ mol de poli(etilenoglicol metacrilato) (macroiniciador) e $1,50 \times 10^{-3}$ mol de 2-etilhexanoato de estanho(II) (catalisador). O sistema foi mantido sob agitação magnética, atmosfera inerte de argônio a temperatura de 120° C durante 3 horas. Após esse tempo, o produto viscoso obtido foi solubilizado em clorofórmio e precipitado com hexano a 0° C. A amostra foi lavada três vezes com hexano a 0° C visando retirar resíduos da síntese. Retirou-se uma alíquota para posterior caracterização.

A adição de um grupo tiol livre terminal à cadeia do copolímero foi feita por meio de uma reação de esterificação entre o grupo hidroxila livre pertencente ao segmento PCL do copolímero e o grupo carboxilato do ácido 3-mercaptopropiônico (61,62). Em um erlenmeyer foram adicionados os reagentes: $4,0 \times 10^{-5}$ mol do copolímero PCL-co-PEGMA (3800 g/mol), $4,0 \times 10^{-5}$ mol de ácido 3-mercaptopropiônico, $4,0 \times 10^{-5}$ mol cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), $4,0 \times 10^{-5}$ mol de trietilamina e 3,0 mL de dimetilformamida (DMF) como meio reacional. A reação prosseguiu sob agitação magnética, atmosfera inerte à temperatura ambiente durante 24 horas. O produto obtido foi dialisado contra água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 M Ω .cm à 25 °C) durante 3 dias e liofilizado.

Adicionou-se grupos aminos ao copolímero HS-PCL-co-PEGMA através de uma reação de polimerização radicalar do grupo metacrilato pertencente ao PEGMA (63,64). A síntese foi adaptada de Pohl e colaboradores (65). Para isto, reagiu-se o copolímero com 2-propenamina (alilamina) na presença do par redox persulfato de potássio e bissulfito de sódio. O persulfato é ativado através da reação de oxirredução com o bissulfito de sódio que culmina na quebra da ligação peróxido (-O-O-) e promove o início ao processo de polimerização (66-68). A reação ocorreu em um erlenmeyer com a adição inicial de $4,0 \times 10^{-5}$ mol do copolímero, $1,0 \times 10^{-3}$ mol de 2-propenamina, $6,0 \times 10^{-5}$ mol de persulfato de potássio e $1,1 \times 10^{-4}$ mol de bissulfito de sódio, nessa ordem. O meio foi purgado com argônio durante 30 minutos. A reação prosseguiu sob agitação magnética à temperatura de 60 °C durante 48 horas. O

produto obtido foi dialisado contra água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 MΩ.cm à 25 °C) durante 3 dias e liofilizado.

A etapa final de modificação do copolímero PCL-co-PEGMA consiste na formação de uma ligação peptídica entre os grupos aminos do copolímero e o grupo carboxilato do ácido fólico (69-75). Em um erlenmeyer foram adicionados os reagentes: $3,0 \times 10^{-5}$ mol do copolímero PCL-co-PEGMA, $4,0 \times 10^{-5}$ mol de ácido fólico, $5,0 \times 10^{-5}$ mol de *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 20,0 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) - meio reacional. A reação prosseguiu sob agitação magnética, atmosfera inerte à temperatura ambiente durante 48 horas. O produto obtido foi dialisado contra água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 MΩ.cm à 25 °C) durante 3 dias e liofilizado.

3.2.3. Obtenção do sistema caroço-casca: nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímero PCL-co-PEGMA

A reação da formação da ligação dissulfeto foi adaptada de Bernkop-Schnurch e colaboradores (76,77). Em um tubo de ensaio foram adicionados os reagentes: 1,0 mg das nanopartículas funcionalizadas com MPTS, 5,0 mg do copolímero PCL-co-PEGMA modificado e 6,0 mL de solução tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4. Para dispersão do copolímero e da nanopartícula, foi utilizada ponteira ultrassônica com amplitude de 21% em modo pulsado (3 segundos ligado e 3 segundos desligado) por 30 minutos. O tubo permaneceu incubado durante 24 horas a 37° C a 500 RPM sob atmosfera ambiente com o intuito de promover a oxidação do grupo tiol, formando a ligação dissulfeto. Lavou-se a amostra três vezes com água ultrapura (Sistema Milli-Q – Millipore, resistividade 18,2 MΩ.cm à 25 °C) seguido de separação magnética, dessa forma eliminando resíduos do copolímero que não reagiram.

3.3. Estudo de incorporação e liberação do fármaco metotrexato.

O estudo de incorporação do fármaco metotrexato nas nanopartículas híbridas foi realizado em tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ em pH 7,4. Solubilizou-se 1, 7 e 17,5 mg do fármaco (correspondente à aproximadamente 3 %, 20 % e 50 % m/m em relação à massa da matriz - nanopartículas) em 1 mL de acetona em um tubo de ensaio junto de 35 mg das nanopartículas sintetizadas e 15 mL de tampão fosfato para a

determinação da eficiência de incorporação. A incorporação do metotrexato foi realizada pelo método da evaporação do solvente (acetona), no qual o fármaco é incorporado e passa a ter interações com o copolímero presente na superfície da nanopartícula. A dispersão foi mantida sob agitação constante de 500 RPM, a 25°C durante 24 horas. Após esse período, as nanopartículas foram removidas por centrifugação (9000 rpm durante 30 minutos) e o sobrenadante foi utilizado na análise espectrofotométrica para determinação de fármaco residual (não incorporado). A concentração de metotrexato foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis com base na lei de Lambert Beer ($A=ab[x]$), na qual a absorção A é proporcional a concentração $[x]$, sendo “ a ” absorvidade molar e “ b ” o caminho ótico da cubeta. A absorção máxima de metotrexato ocorre no comprimento de onda de 303 nm, valor fixado para determinação das concentrações do fármaco. A curva analítica foi obtida a partir de uma solução de metotrexato na faixa de concentração de 0 a 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, cuja reta obtida apresentou coeficiente de correlação de 0,9972 e absorvidade de 0,0304 $\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A eficiência de incorporação e o teor de metotrexato foram obtidas, respectivamente, pelas **Equação 1** e **Equação 2**, no qual m_f e m_i correspondem à massa de fármaco livre e massa de fármaco inicial, respectivamente (78).

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

$$\text{Teor de fármaco (\%)} = \left(\frac{m_{\text{fármaco incorporado}}}{m_{\text{fármaco incorporado}} + m_{\text{nanopartículas}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

O estudo de liberação do metotrexato foi realizado a partir da dispersão das amostras de copolímeros contendo metotrexato que apresentaram melhor resultado de incorporação. O material foi disperso em 0,5 mL de tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} pH 7,4 e transferido quantitativamente para uma membrana de diálise (poro molecular 2000 g mol^{-1}). A liberação foi determinada por espectroscopia UV-Vis, em função do tempo, a 37 °C. Em intervalo de tempo regular, foram removidas alíquotas de 0,75 mL do meio de liberação e substituídas pelo mesmo volume de tampão fosfato. A porcentagem de liberação cumulativa de metotrexato foi calculada de acordo com a **Equação 3**, no qual m_{MTX} corresponde a massa de metotrexato presente na nanopartícula, V_0 é o volume total do meio de liberação ($V_0 = 15,0 \text{ mL}$), V_t é o volume

de alíquotas removida no tempo t ($V_t = 0,75$ mL) e C_n é a concentração de metotrexato na amostra (79).

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{v_t \sum_{i=1}^{n-1} C_i + v_0 C_n}{m_{MTX}} \times 100$$

Equação 3

3.4. Caracterização

3.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho médio (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho médio foram obtidos com o espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da Bruker, modelo Vertex 70. Para coleta dos espectros foram realizadas 64 varreduras entre o intervalo 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos pela técnica de reflexão total atenuada (ATR) utilizando cristal de diamante (80). Não foi necessário o preparo prévio das amostras.

3.4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos com o espectrofotômetro com transformada de Fourier da Bruker, modelo Fourier 300. Para a coleta dos espectros foram realizadas 128 aquisições a temperatura de 25° C com campo magnético de 7,1 T e frequência de 300 MHz. As amostras foram diluídas em CDCl_3 e DMSO-d_6 (aproximadamente 10 mg). A linha de referência empregada na análise foi de 7,28 ppm referente ao CDCl_3 e 2,50 ppm referente ao DMSO-d_6 .

3.4.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O espectro de absorbância e a curva analítica do fármaco Metotrexato foram obtidos com o espectrofotômetro de UV-Vis da PerkinElmer, modelo Lambda 465, o qual 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, possuindo resolução óptica de 1 nm. As amostras foram medidas à 25° 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, removidas através de centrifugação ou membrana de diálise.

3.4.4. Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X (DRX) foram obtidos em um difratômetro Siemens, modelo D5000. O intervalo de varredura 2θ foi de 5° a 90° , com velocidade de varredura de $0,02^\circ$ por segundo, empregando radiação $\text{Cu}(K\alpha)$ $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$.

3.4.5. Potencial Zeta (ζ)

O potencial Zeta (ζ) foi determinado, indiretamente, em um equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. O equipamento calcula o potencial zeta a partir de valores de mobilidade eletroforética, aplicando a equação de Henry (**Equação 4**). A mobilidade eletroforética é medida aplicando potencial em cada eletrodo da cubeta. As partículas carregadas migram para o eletrodo de carga oposta quando sua velocidade é determinada. As amostras foram dispersas em solução aquosa de NaCl $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. Para dispersão das nanopartículas foi utilizada ponteira ultrassônica com amplitude de 21% em modo pulsado (3 segundos ligado e 3 segundos desligado) por 30 minutos. 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 (81).

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3n} \quad \text{Equação 4}$$

na qual U_e corresponde à mobilidade eletroforética, ζ ao potencial zeta, ε à constante dielétrica do meio, n à viscosidade do meio e $f(ka)$ à função de Henry.

3.4.6. Diâmetro Hidrodinâmico (D_h)

O diâmetro hidrodinâmico (D_h) 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 a luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25° C . A técnica de espalhamento de luz dinâmico relaciona o tamanho das partículas com o movimento Browniano. O movimento Browniano refere-se à movimentação das partículas devido a colisões randômicas

com as moléculas dos líquidos que as circundam. Dessa forma, o detector registra as flutuações de intensidade de luz espalhada ao incidir um feixe de laser sobre as partículas em movimento, relacionando o tamanho das partículas através da equação de Stokes – Einstein (**Equação 5**) (81). Para dispersão das nanopartículas foi utilizada ponteira ultrassônica com amplitude de 21% em modo pulsado (3 segundos ligado e 3 segundos desligado) por 30 minutos.

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Equação 5}$$

na qual D_h corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, D ao coeficiente de difusão translacional, k à constante de Boltzmann, T à temperatura e η à viscosidade.

3.4.7. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A distribuição de massa molecular do copolímero foi determinada em um cromatógrafo de permeação em gel OMNISEC, da Malvern Instruments. Foi utilizado o detector de índice de refração Viscotek RImax (Malvern Instruments) na obtenção do sinal.

As amostras de copolímero, com e sem modificações, foram diluídas em 1 mL de DMF e filtradas em membranas de PTFE 0,45 μm . Foram utilizadas duas colunas cromatográficas da marca Shodex, modelo KD-801 e KD-803 (SHOWA Denko, Tóquio, Japão), cuja temperatura foi mantida constantemente a 60 °C. Foi utilizado fluxo de injeção de DMF na razão de 1,0 mL min^{-1} . A curva de calibração foi obtida a partir de padrões de PE, cujas massa moleculares estão compreendidas entre $4,2 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^3$ g mol^{-1} (Varian Palo Alto, CA).

3.4.8. Termogravimetria (TG)

O estudo térmico das amostras foi realizado utilizando um equipamento da marca Mettler Toledo modelo TG/DSC-1. Para isto, ajustou a razão de aquecimento em 10 °C min^{-1} sob atmosfera de nitrogênio (N_2) com vazão de 50 mL min^{-1} , cadinhos de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ de 70 μL e a faixa de temperatura analisada foi entre 30 ° e 800 °C. Para

a realização das medidas foram utilizadas 5 mg das amostras e não foi necessário o preparo das mesmas.

3.4.9. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Em complementação a termogravimetria, realizou-se análises de calorimetria exploratória diferencial no qual foi utilizado um equipamento Mettler Toledo modelo TG/DSC-1. As amostras foram analisadas entre 30 ° e 800 °C, com fluxo de nitrogênio (N₂) com vazão de 50 mL min⁻¹, cadinhos de α -Al₂O₃ de 70 μ L e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Para a realização das medidas foram utilizadas 5 mg das amostras e não foi necessário o preparo das mesmas.

4. Resultados e discussão.

4.1. Copolímero PCL-co-PEGMA-AF

O copolímero obtido foi caracterizado estruturalmente por intermédio de espectroscopia na região do infravermelho médio e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A **Figura 7** apresenta o espectro de transmitância na região do infravermelho da amostra PCL-co-PEGMA e suas posteriores modificações. As bandas fracas em 2940 e 2852 cm^{-1} devem-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 cm^{-1} que condiz com grupos carbonila referentes à ligação éster proveniente da cadeia de policaprolactona. Observou-se a banda em 1636 cm^{-1} que é referente a presença da ligação C=C, proveniente do grupo terminal metacrilato que existe no PEGMA. Foi possível observar bandas do estiramento C–O em torno de 1100 cm^{-1} (82-85). As bandas que aparecem entre 700 e 1500 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 (86). A modificação com o ácido 3-mercaptopropiônico resultou na adição de um grupo tiol a estrutura da molécula e foi confirmada através do surgimento de uma banda fraca em 683 cm^{-1} . Não foi possível identificar a banda atribuída à ligação S-H, cuja banda característica se encontra em 2500-2550 cm^{-1} . A polimerização do grupo metacrilato com a 2-propenammina foi confirmada principalmente através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e indiretamente pela espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Apesar de não ter sido possível identificar nenhuma banda relacionada ao grupo amino, no espectro da amostra que contém a molécula de ácido fólico permite afirmar que houve a polimerização e posteriormente a reação de condensação (formação da ligação peptídica) entre estes grupos aminos e o grupo carboxilato do ácido fólico. As bandas de baixa intensidade que confirmam a presença do ácido fólico na estrutura do copolímero se localizam em 1605, 1573 e 1534 cm^{-1} , que são características de anel benzeno *para*-substituído.

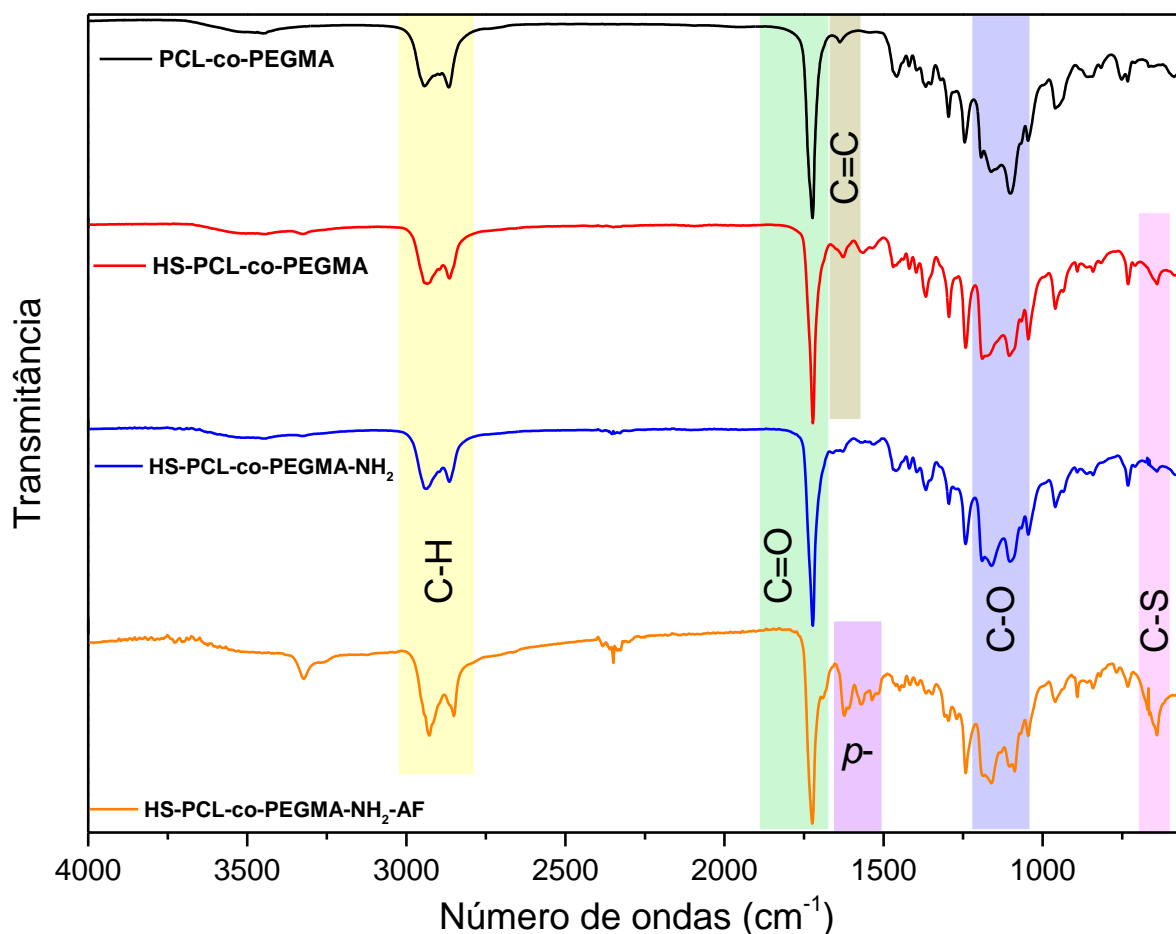


Figura 7 – Espectro de transmitância na região do infravermelho da amostra PCL-co-PEGMA e suas posteriores modificações.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio permitiu obter informações da estrutura polimérica das amostras analisadas.

A **Figura 8** apresenta os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para as amostras do copolímero após todas as modificações, no qual foi possível identificar grupos metileno e metacrilato pertencentes ao PEGMA e grupos metileno pertencentes ao PCL, os grupos metilênicos e o hidrogênio do grupo tiol livre pertencente ao ácido 3-mercaptopropiônico, a modificação com a 2-propenamina e a identificação de hidrogênios atribuídos aos anéis aromáticos que compõe a molécula do ácido fólico (AF), no decorrer das etapas sintéticas. Os picos referentes ao grupo metacrilato do PEGMA apresentam-se em 6,13, 5,58 e 1,95 ppm (87,88) enquanto os picos dos grupos metilênicos apresentam-se sobrepostos em 3,68 ppm. Quanto ao PCL, a presença de seus grupos metileno são observados em aproximadamente 1,40, 1,65, 2,33 e 4,07 ppm (82,85). A adição do ácido 3-

mercaptopropiônico ao copolímero é confirmado pelo surgimento de picos em 2,63, 2,98 e 1,42 ppm (89-92). É possível observar a sobreposição dos picos **2** e **4** que são atribuídos aos grupos metilênicos do PCL e dos picos **3** e **12** que são atribuídos ao grupo metilênico do PCL e do hidrogênio do grupo tiol do ácido 3-mercaptopropiônico, respectivamente. A polimerização entre o grupo metacrilato do PEGMA e a 2-propenammina é confirmada através do surgimento de um pico em 2,05 ppm atribuído ao hidrogênio do carbono terciária ligado ao grupo amino. Posteriormente, o grupo amino sofreu uma reação de condensação (acoplamento) com o grupo ácido carboxílico do ácido fólico. Há o surgimento de picos em 6,62, 7,63, 7,74 e 8,65 ppm atribuídos aos hidrogênios do anel aromático e aos hidrogênios ligados à átomos de nitrogênio na molécula de ácido fólico (93-95). Não foi possível observar o surgimento/desaparecimento do pico referente ao hidrogênio ligado ao grupo amino da 2-propenammina prévio ou posterior a modificação com o ácido fólico. O deslocamento de alguns picos para o espectro que apresenta a modificação com o ácido fólico é devido a alteração do solvente deuterado utilizado durante a medida. Inicialmente utilizou-se o clorofórmio deuterado e, posteriormente, utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado.

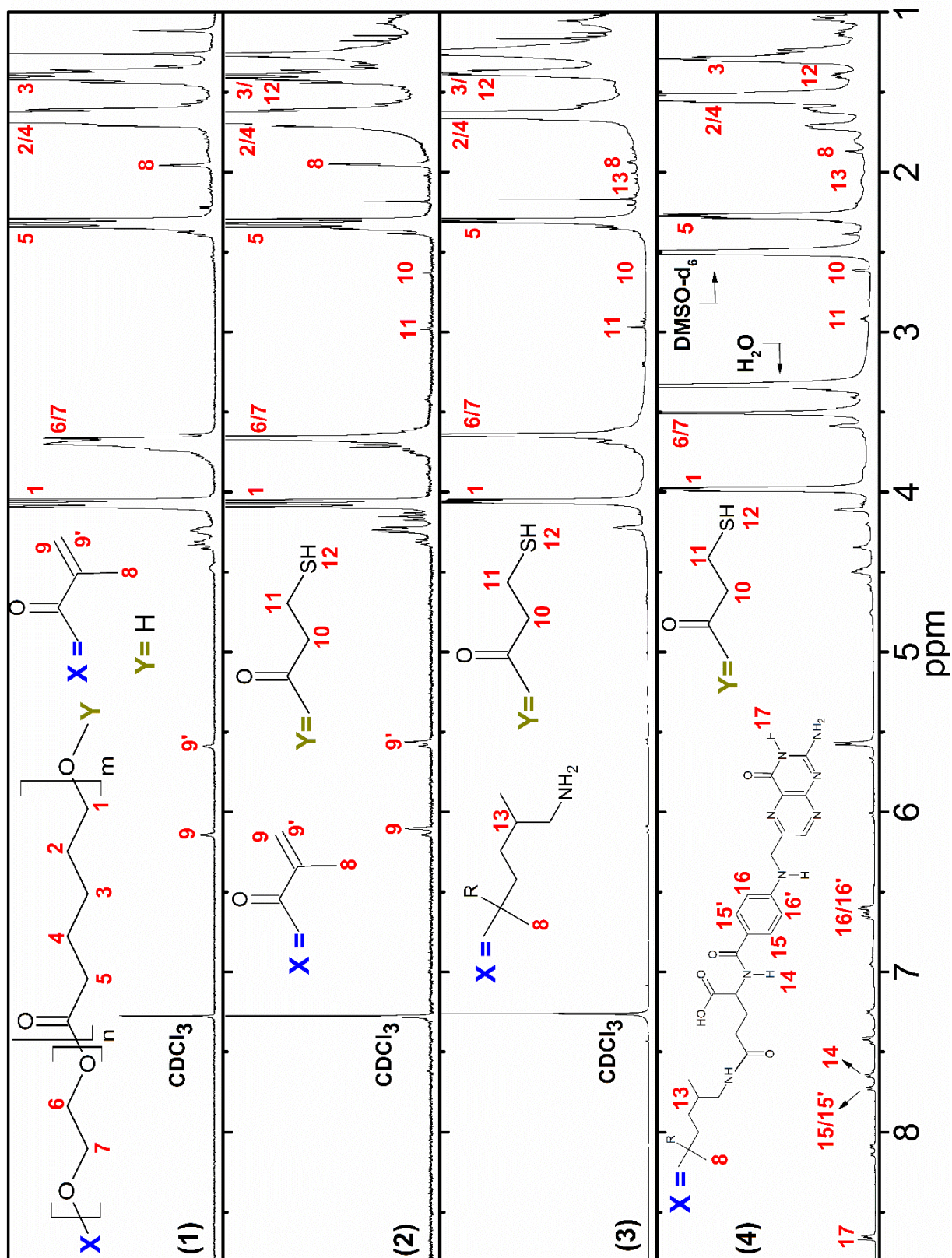


Figura 8 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio das amostras (1) PCL-co-PEGMA, (2) HS-PCL-co-PEGMA, (3) HS-PCL-co-PEGMA-NH₂ e (4) HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF, respectivamente.

Ao analisar as amostras dos copolímeros através da cromatografia de permeação em gel, foi possível obter informações acerca da distribuição de massa molecular. Para isto, construiu-se uma curva analítica a partir de padrões comerciais de poliestireno (PE) com massas moleculares conhecidas e seus valores são apresentados na **Tabela 1**. O ajuste da curva analítica foi feito através de polinômio de terceira ordem utilizando o programa OminiSec (software do equipamento) e é apresentado na **Figura 9**.

Tabela 1 – Padrões comerciais de PE utilizados no preparo da curva de calibração do método de cromatografia de permeação em gel (GPC).

Padrões	Mp	Mw	Mn
<i>PS4500K</i>	4200000	4480000	3930000
<i>PS2000K</i>	1900000	1970000	1790000
<i>PS940K</i>	940000	950000	925000
<i>PS400K</i>	400000	410000	395000
<i>PS170K</i>	170000	171000	164000
<i>PS105K</i>	103500	104401	101009
<i>PS78K</i>	77000	78200	76000
<i>PS30K</i>	29600	30100	29100
<i>PS13K</i>	13400	13700	13100
<i>PS6000</i>	6040	6220	5870
<i>PS2500</i>	2560	2630	2500
<i>PS1200</i>	1200	1241	1160

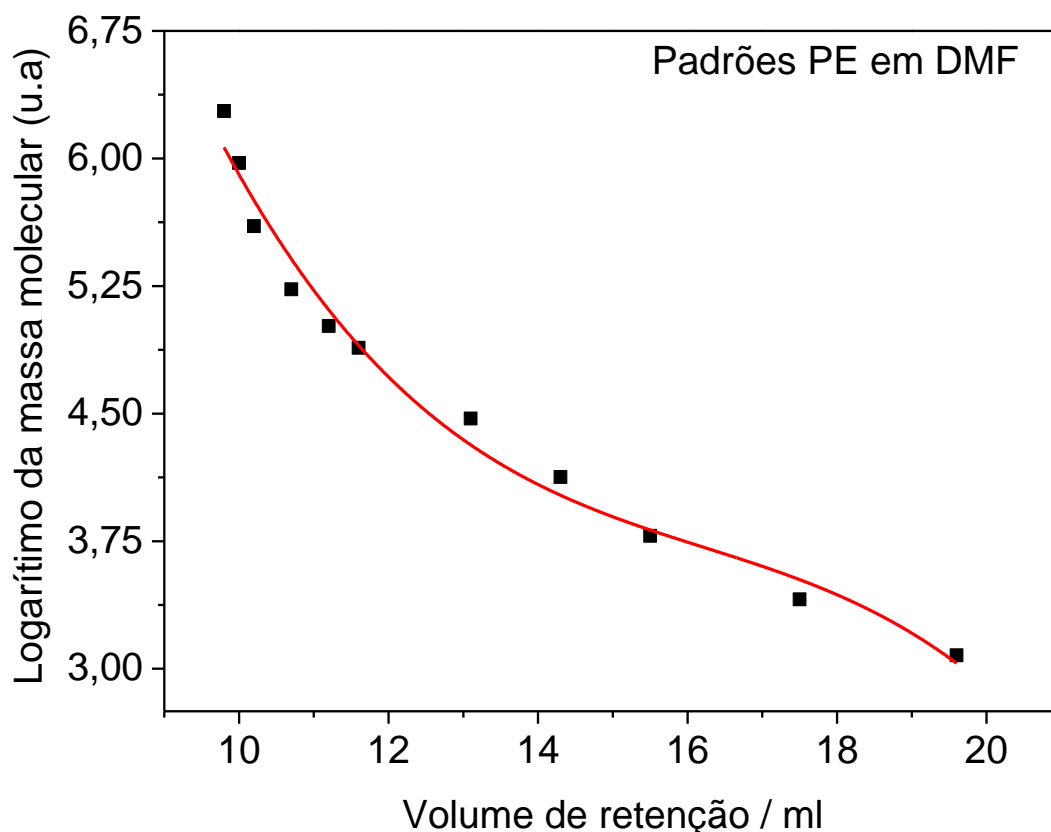


Figura 9 - Curva de calibração para os padrões de PE com diferentes massas moleculares em DMF.

O perfil cromatográfico das amostras pode ser observado na **Figura 10**. A amostra PCL-co-PEGMA possui a menor massa molecular dentre as amostras analisadas, enquanto a amostra HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF possui a maior. Essa diferença era esperada uma vez que houve modificações na cadeia do copolímero que culminaram no aumento do tamanho da cadeia. A adição do ácido 3-mercaptopropiônico ao final do segmento hidrofóbico da cadeia (PCL) provoca um aumento mínimo no comprimento da cadeia do polímero PCL-co-PEGMA. Essa pequena diferença é em função da baixa massa molecular do ácido utilizado e por ser adicionado apenas uma molécula ao final de cada cadeia. A modificação posterior, relacionada à polimerização com a 2-propenammina, provoca maior aumento na massa molecular quando comparado a adição do ácido. Isto ocorre devido ao maior número de moléculas da amina adicionadas ao longo da cadeia do copolímero. Ao adicionar a molécula de ácido fólico ao final do segmento hidrofílico (PEG) do copolímero, provocou um maior aumento na massa molecular do copolímero do que as modificações anteriores. Isto ocorreu em virtude da maior massa molecular da

molécula de ácido fólico em comparação com as demais moléculas citadas anteriormente. Todas as amostras apresentaram curvas de distribuição característica da função gaussiana e a variação na linha-base para as amostras PCL-co-PEGMA e HS-PCL-co-PEGMA pode ser atribuída a presença de contaminantes no DMF utilizado durante a análise. A **Tabela 2** apresenta o aumento na massa molecular após as modificações do copolímero PCL-co-PEGMA obtido através do GPC.

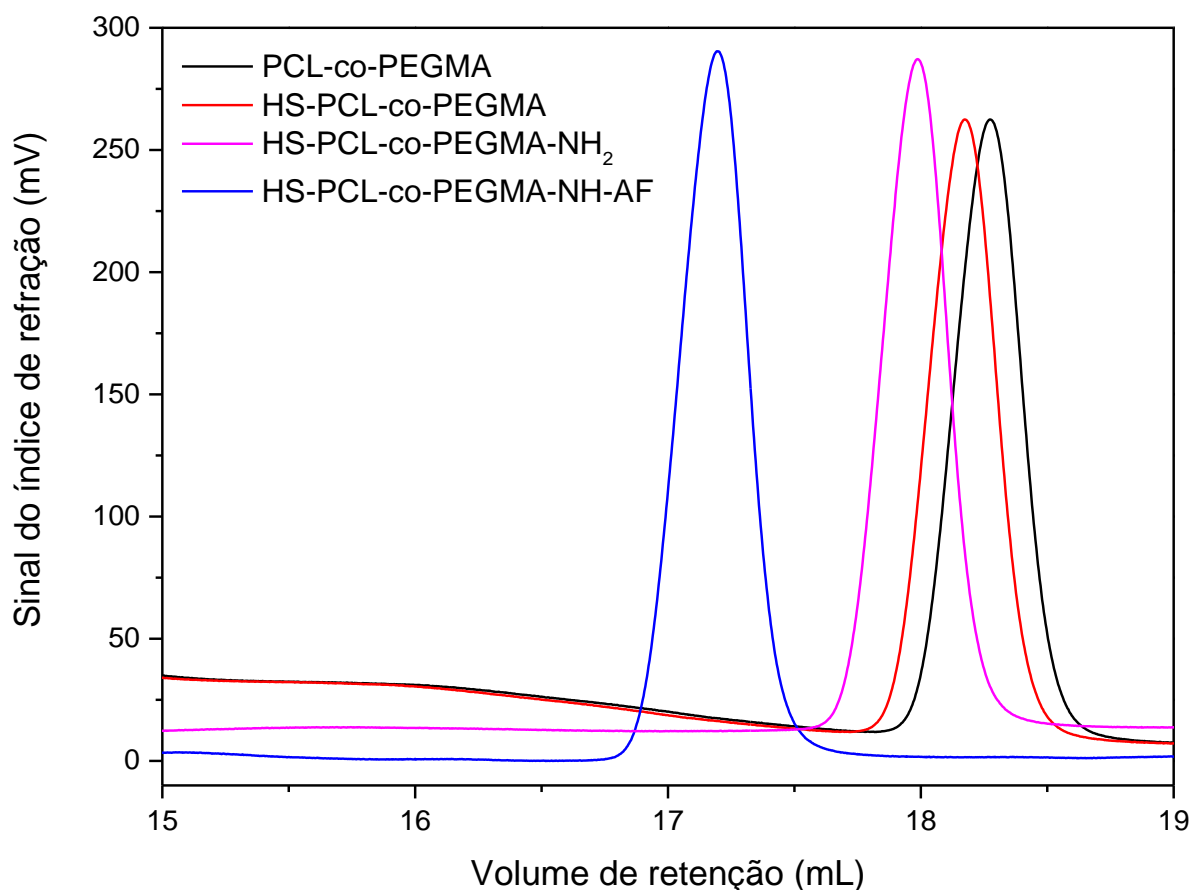


Figura 10 - Cromatograma das amostras PCL-co-PEGMA, HS-PCL-co-PEGMA, HS-PCL-co-PEGMA-NH₂ e HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF, respectivamente.

Tabela 2 - Distribuição das massas molares das amostras do copolímero e suas modificações obtida por GPC.

Amostra	Mn (g mol ⁻¹)	Mw (g mol ⁻¹)	Mw/Mn
PCL-co-PEGMA	2383 ± 26	2409 ± 11	1,011 ± 0,006
HS-PCL-co-PEGMA	2499 ± 37	2506 ± 15	1,003 ± 0,011
HS-PCL-co-PEGMA-NH ₂	2749 ± 32	2760 ± 14	1,004 ± 0,010
HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF	3776 ± 29	3810 ± 18	1,009 ± 0,009

4.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (fase magnetita) funcionalizadas com MPTS

No presente trabalho, optou-se por seguir o método da coprecipitação para a síntese das nanopartículas magnéticas. Esse método foi adaptado da síntese original proposta por Massart (58). A amostra final obtida é uma dispersão coloidal magnética e de coloração preta. O comportamento magnético pode ser observado na **Figura 11**.



Figura 11 - Aspecto visual e magnético da dispersão coloidal das nanopartículas de óxido de ferro em meio aquoso.

Foi realizado uma análise de difração de raios X a fim de verificar a presença da fase magnetita na amostra de óxido de ferro sintetizado. A confirmação ocorreu comparando-se o difratograma de raios X da amostra e o padrão de difração obtido na literatura. O padrão utilizado para comparação é proveniente do banco de dados JCPDS. A **Figura 12** apresenta o difratograma de raios X da amostra e o padrão de difração PDF n° 19-629.

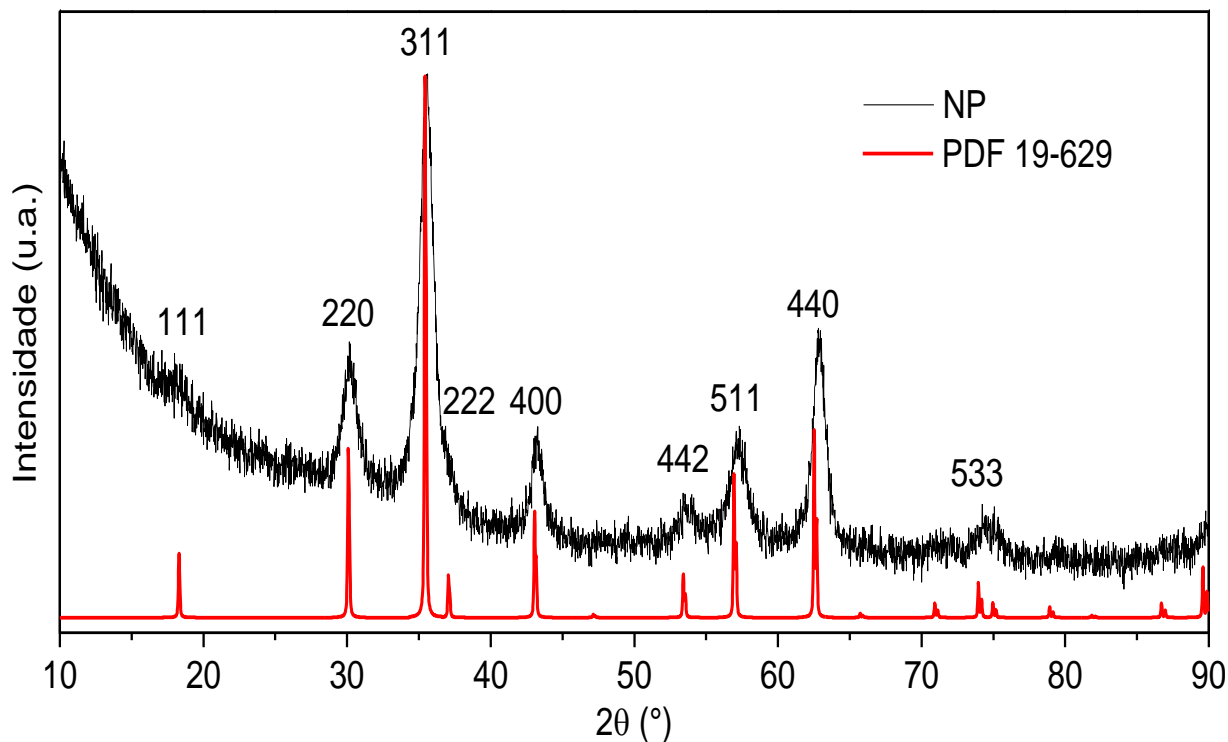


Figura 12 - Difratoograma de raios X da amostra de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (fase magnetita) e do padrão PDF n° 19-629 para comparação.

Por meio do difratograma apresentado na **Figura 12** é possível observar a concordância entre os picos de Bragg apresentados pela amostra e o padrão de difração. Os principais picos observados na amostra se situam em 18,3°, 30,2°, 35,5°, 43,2°, 53,6°, 57,3°, 62,8° e 74,2° enquanto que os picos correspondentes da carta se localizam em 18,3°, 30,1°, 35,4°, 43,1°, 53,4°, 56,9°, 62,5° e 73,9°. Devido a forma nanométrica do material analisado, verifica-se o alargamento dos picos. Esse alargamento dos picos é responsável pela sobreposição do pico em 37,0° (referente ao plano [222]) pelo pico em 35,5°. Há a presença do pico em 37,0° na carta de referência, porém o mesmo é sobreposto no difratograma da amostra.

A funcionalização das nanopartículas com (3-mercaptopropil)triétoxissilano (MPTS) foi responsável pela adição de grupos tióis livres na superfície das nanopartículas. A síntese realizada foi baseada no artigo de KRAUS e colaboradores (59). A confirmação da funcionalização foi baseada na espectroscopia na região do infravermelho médio. A **Figura 13** apresenta o espectro de transmitância na região do infravermelho para as amostras pré e pós-funcionalização.

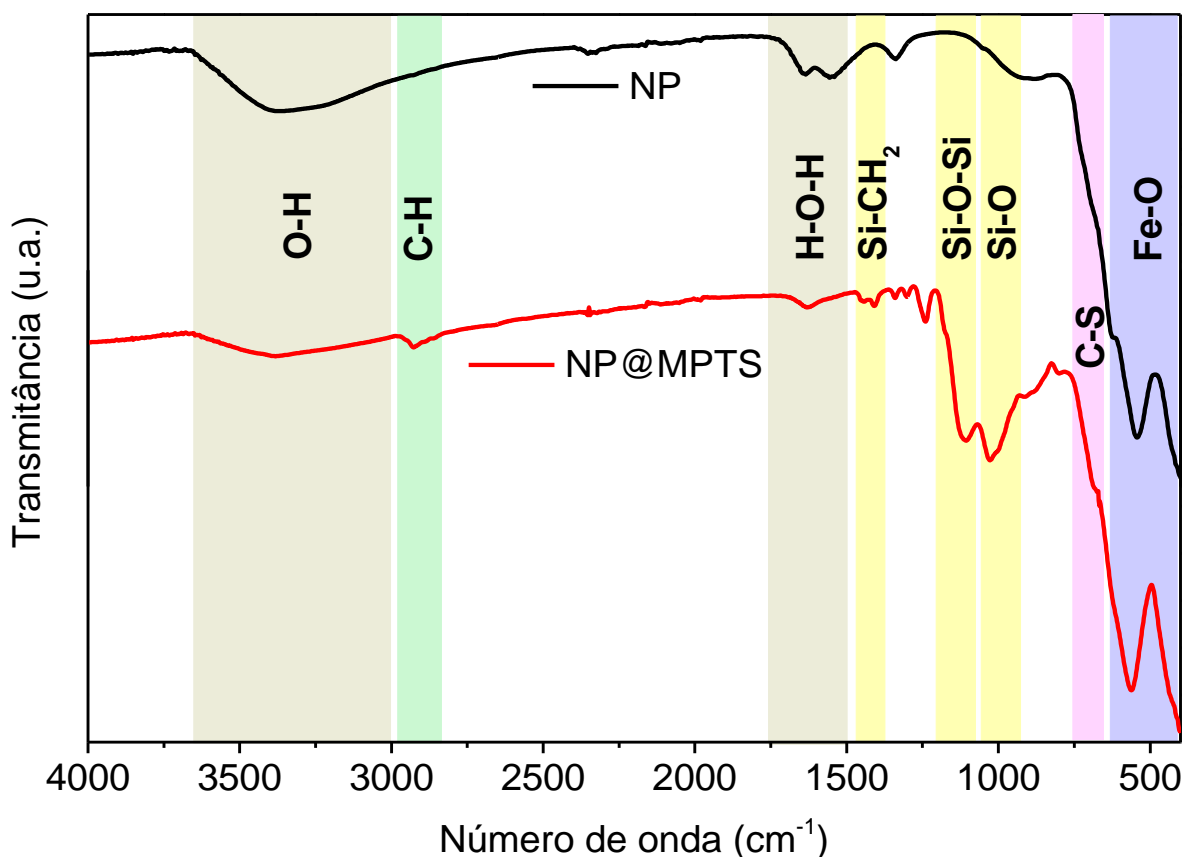


Figura 13 - Espectros na região do infravermelho médio para as amostras de nanopartículas pré e pós-funcionalização com o agente de superfície MPTS.

É possível observar por meio do espectro apresentado na **Figura 13** que houve êxito na funcionalização das nanopartículas com MPTS. Na amostra antes da funcionalização, há a presença de bandas relacionadas às ligações ferro-oxigênio, característico na existência de óxido de ferro, e bandas referentes às ligações oxigênio-hidrogênio presentes nas moléculas de água que hidratam (adsorção) a superfície das nanopartículas. Observa-se uma banda larga em 3400 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento da ligação O-H (livre) e em 1600 cm^{-1} atribuída a deformação angular da molécula de água. As duas bandas estão presentes em ambas as amostras, o que indica a interação das moléculas de água com as nanopartículas, mesmo uma das amostras estando funcionalizada. Em ambas as amostras há a presença de duas bandas fortes em 415 e 550 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação Fe-O. A confirmação da funcionalização é dada pela presença de quatro bandas na amostra NP@MPTS: a primeira em 2925 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-H, a segunda em 1409 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação Si-CH₂, a

terceira banda (dupla) em 1116 e 1027 cm^{-1} atribuídas respectivamente aos estiramento das ligações Si-O-Si e Si-O (83,96) e a quarta banda em 682 cm^{-1} atribuído a ligação C-S (97). Não foi possível detectar a banda atribuída à ligação S-H (grupo tiol livre) devido à pouca quantidade relativa de tiol e a baixa sensibilidade da técnica ao grupo tiol (96).

4.3. Síntese do sistema caroço-casca: nanopartículas magnéticas funcionalizadas com copolímero PCL-co-PEGMA contendo ligação dissulfeto.

A formação da casca (copolimérica) sobre o caroço (nanopartícula) foi realizada mediante a formação de uma ligação dissulfeto. Tanto o copolímero quanto a nanopartícula possuíam um grupo tiol livre para tal função. A síntese desta ligação foi adaptada do artigo de BERNKOP-SCHNURCH e colaboradores (76,77). A **Figura 14** apresenta os espectros na região do infravermelho médio para as amostras funcionalizadas.

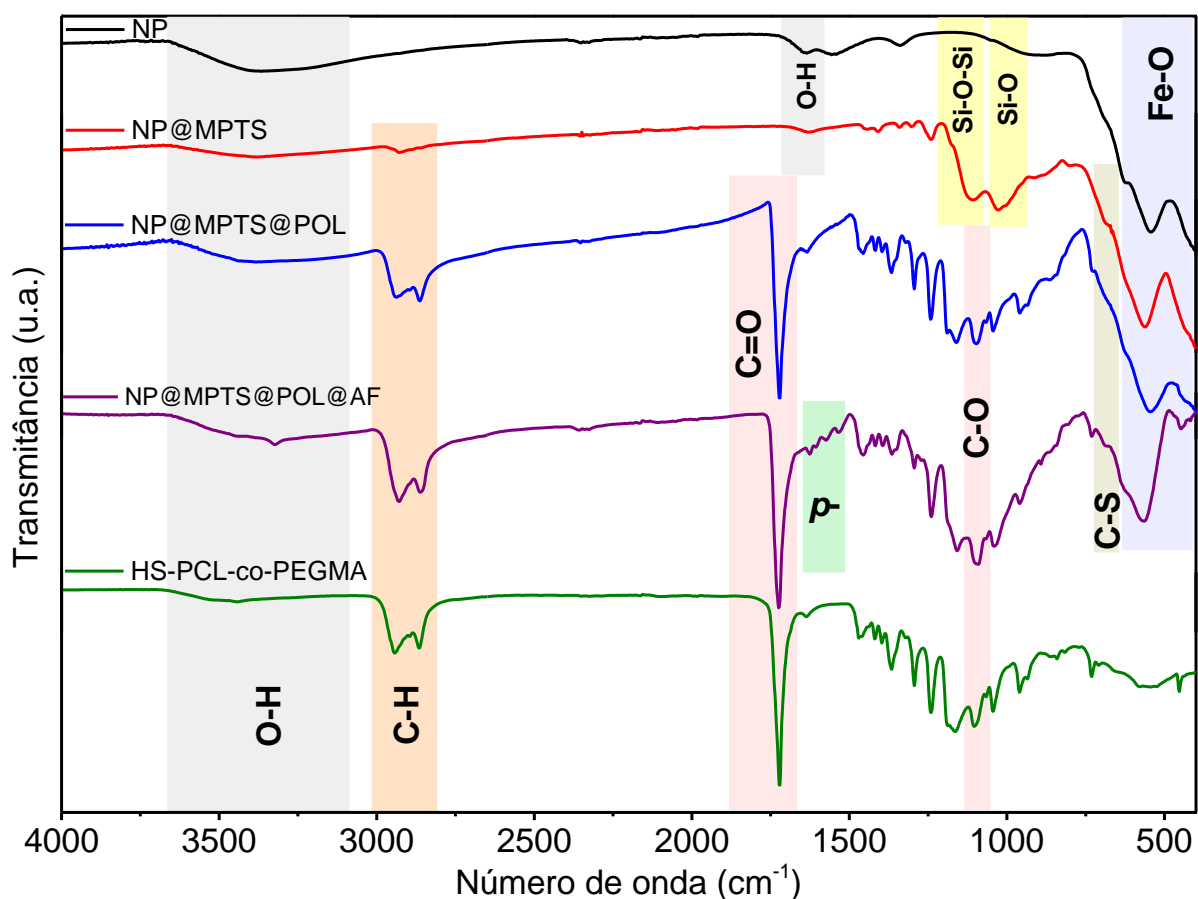


Figura 14 - Espectros na região do infravermelho médio para as amostras NP, NP@MPTS, NP@MPTS@POL, NP@MPTS@POL@AF e HS-PCL-co-PEGMA, nessa ordem.

Os espectros na região do infravermelho das amostras NP e NP@MPTS estão apresentados na **Figura 14**. As atribuições para as bandas referentes à ambas

amostras foram feitas na discussão da **Figura 13**, mas seus espectros estão presentes para facilitar a comparação com as demais amostras.

O espectro da amostra HS-PCL-co-PEGMA apresenta bandas em função da cadeia carbônica referentes a estrutura química do copolímero. As bandas fracas em 2942 e 2858 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento da ligação C-H dos grupos metilênicos ($-\text{CH}_2-$). O estiramento da ligação C=O foi observado em 1718 cm^{-1} , condizente com a presença de grupos carbonila referentes à ligação éster proveniente da cadeia de policaprolactona. Observou-se as bandas em 1636 e 1042 cm^{-1} que são referentes a presença da ligação C=C, proveniente do grupo terminal metacrilato que existe no PEGMA. Foi possível observar bandas do estiramento C-O em torno de 1163 cm^{-1} (82-85). As atribuições para as bandas referentes à ambas amostras foram feitas na discussão da **Figura 7**, mas seus espectros estão presentes para facilitar a comparação com as demais amostras. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi fundamental para corroborar as informações obtidas da espectroscopia na região do infravermelho.

O espectro da amostra NP@MPTS@POL condiz com o esperado, ou seja, há a presença de bandas tanto do copolímero quanto da nanopartícula, com a ocorrência das bandas nas mesmas regiões. A ausência das bandas relacionadas aos grupos siloxanos é devido a sobreposição das bandas da cadeia carbônica do copolímero. Isto pode ser explicado com base no excesso de copolímero utilizado na síntese. Não foi possível detectar a banda relacionada à ligação dissulfeto, em virtude da ausência de momento de dipolo entre os átomos de enxofre.

A adição da molécula de ácido fólico (amostra NP@MPTS@POL@AF) ao final da cadeia copolimérica foi confirmada através da detecção do tipo de substituição do anel aromático presente na estrutura da molécula. As bandas em 1605, 1573 e 1534 cm^{-1} caracterizam o anel benzeno *para*-substituído (97). Bandas adicionais que poderiam ser utilizadas para corroborar a modificação do copolímero se encontram sobrepostas as bandas do copolímero, tornando necessário o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (98).

Por meio da análise térmica das amostras foi possível determinar a quantidade de copolímero na superfície das nanopartículas e os fenômenos envolvidos e seus efeitos com o aumento da temperatura. A termogravimetria (TG) possibilitou identificar as regiões de temperatura no qual há a perda de massa da amostra analisada,

enquanto a calorimetria exploratória diferencial (DSC) permitiu identificar os fenômenos que ocasionaram a perda de massa. A **Figura 15** apresenta a curva TG e a **Figura 16** apresenta a curva DSC das nanopartículas antes e depois da funcionalização e do copolímero modificado. A amostra das nanopartículas sem funcionalização apresenta uma perda de massa de aproximadamente 13 % após atingir 800 °C na curva da TG e possui um evento largo exotérmico que compõe a maior parte da curva. Todas as amostras apresentam um evento abrupto na curva de DSC acima a 450 °C. Esse evento permite afirmar que ocorre um processo de dessorção (desidratação) das moléculas de água adsorvidas na superfície das nanopartículas, mesmo na presença do copolímero, e essa água fica “aprisionada” entre a amostra e o cadinho, minimizando o contato amostra-cadinho que resulta no gráfico obtido. A amostra do copolímero apresenta duas perdas de massa na curva TG, uma em aprox. 220 °C e outra em 450 °C, enquanto na curva DSC apresenta 4 eventos endotérmicos: 33°, 49°, 220° e 420 °C. Os eventos em 33 °C e em 49 °C podem ser atribuídos à cristalização (T_c) e a fusão (T_m) do segmento PCL do copolímero, respectivamente (99). O evento em 220 °C, no qual há perda de massa da amostra identificada pela TG, é atribuído ao processo de desidratação (T_{deh}) das moléculas de água adsorvidas no segmento PEGMA do copolímero, devido às interações intermoleculares presentes. O evento em 420 °C está relacionado ao início da decomposição (T_{dec}) da amostra. A amostra das nanopartículas híbridas apresentou perdas de massa e os primeiros três eventos do DSC aproximadamente nas mesmas temperaturas que a amostra do copolímero, no entanto apresentou o quarto evento do DSC em 340 °C e não em 420 °C, indicando que o processo de decomposição tem início em 340 °C devido a presença das nanopartículas que atuam como um condutor do calor para a decomposição (69-71). A porcentagem de copolímero na superfície das nanopartículas identificada pela termogravimetria foi de aproximadamente 60 %.

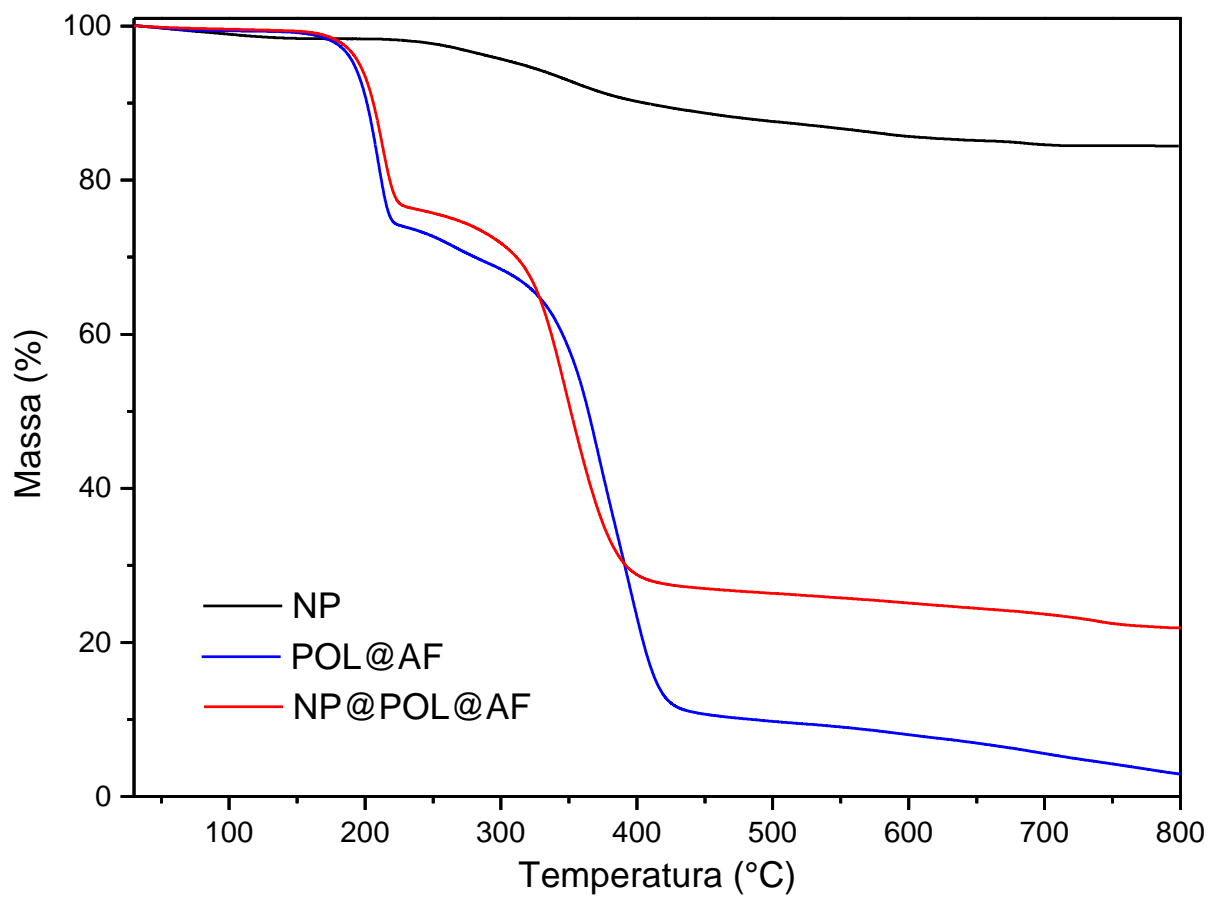


Figura 15 - Curva TG das amostras de nanopartículas com e sem funcionalização e do copolímero modificado.

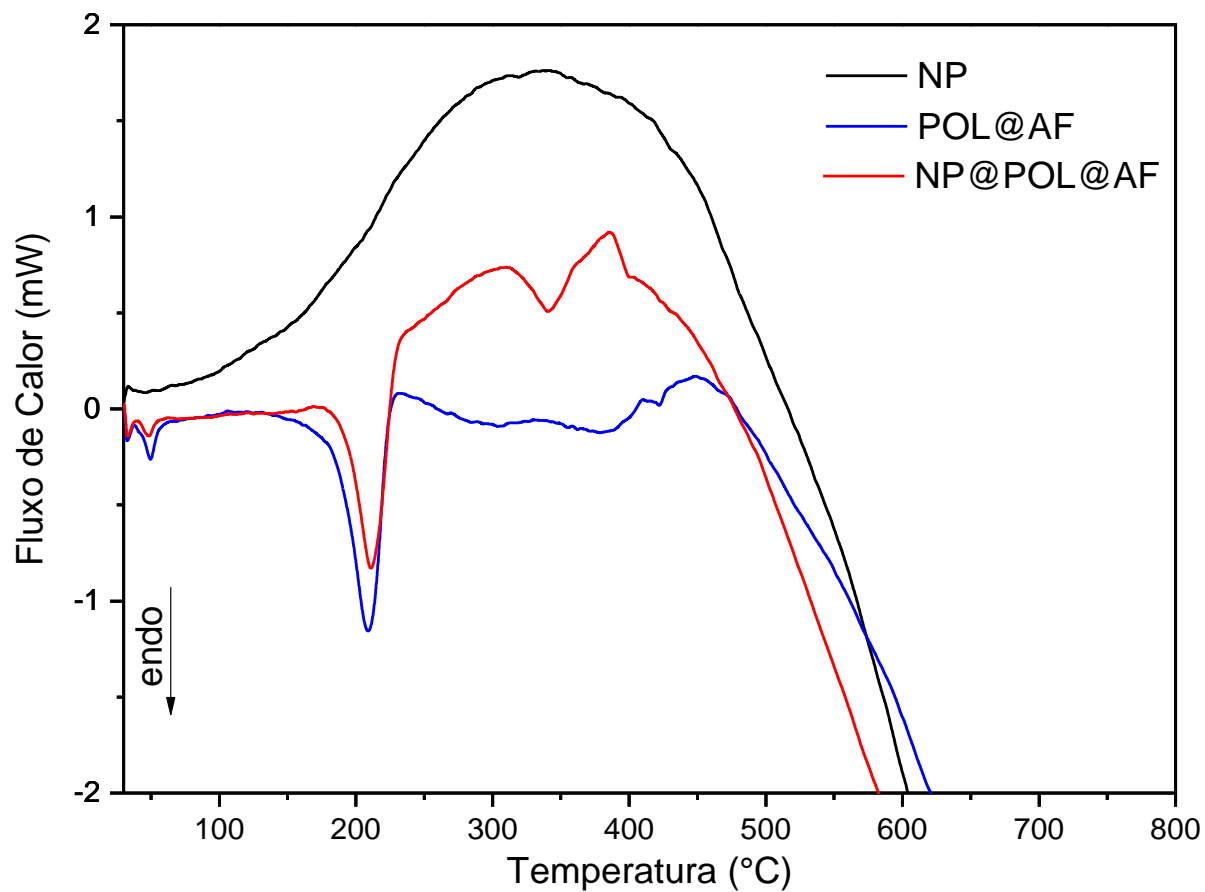


Figura 16 - Curva de DSC das amostras de nanopartículas com e sem funcionalização e do copolímero modificado.

4.4. Caracterização Coloidal

A caracterização da superfície das nanopartículas foi realizada através do potencial zeta (ζ) e da distribuição do diâmetro hidrodinâmico. Ao avaliar o comportamento dessas propriedades frente a mudanças de pH é possível prever as respostas da nanoplateforma quando aplicada ao corpo humano. Alterações no valor do pH do meio provoca a protonação/desprotonação dos grupos funcionais presentes na superfície da nanopartícula e, dessa forma, altera suas características. A **Figura 17** apresenta a variação do potencial zeta das nanopartículas em função do pH.

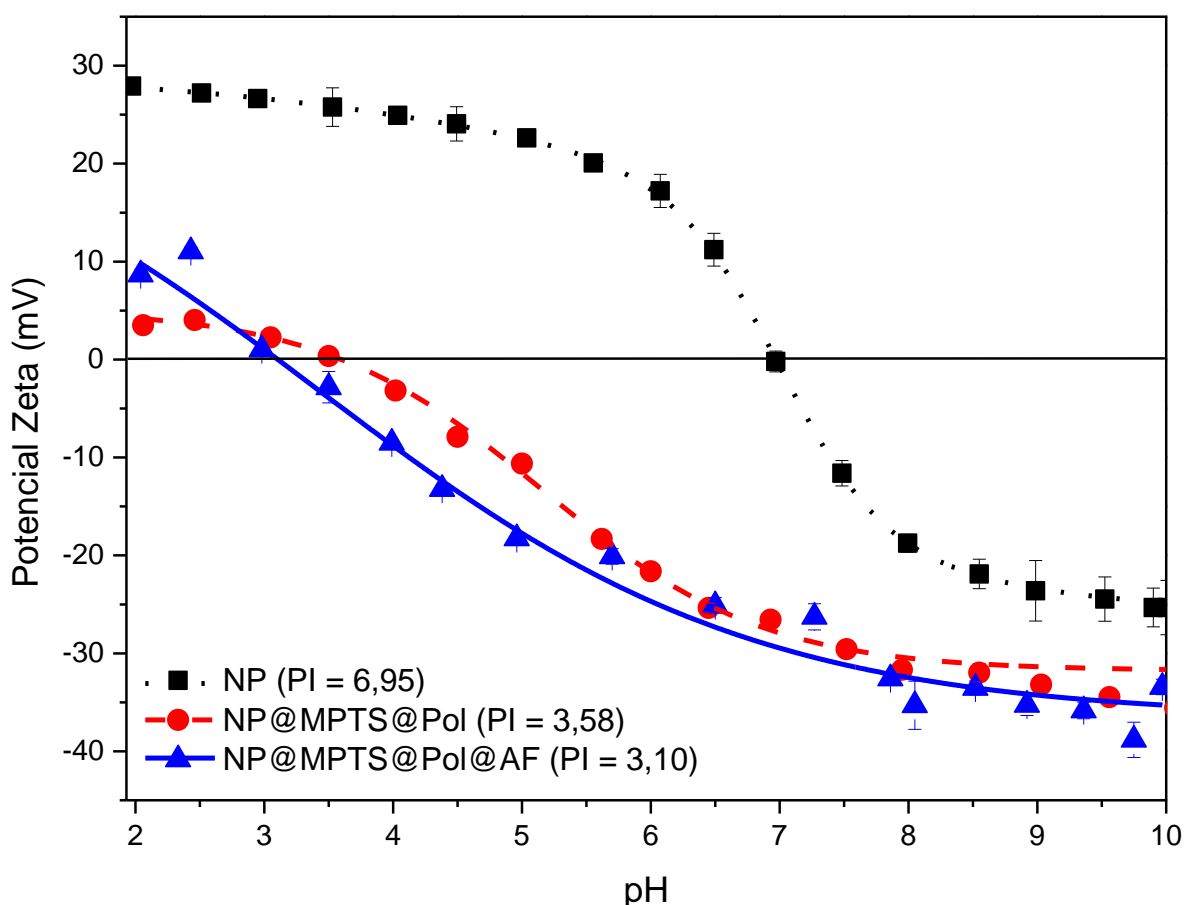


Figura 17 - Curva de titulação do potencial zeta (ζ) das amostras de nanopartículas à 25 °C.

É possível visualizar uma diferença no formato das curvas apresentadas na **Figura 17**. Essa alteração é justificada com base nas diferentes superfícies presentes entre as nanopartículas. A amostra NP composta apenas de óxido de ferro possui em sua superfície grupos $\text{Fe}^{(+2,+3)}\text{O}_x$. Quando o valor do pH do meio é igual ao PI (ponto

isoeletrico), as cargas de superfície estão balanceadas e a carga líquida da superfície é igual a zero (81). Nesse ponto, não haverá uma carga líquida para promover a repulsão eletrostática entre as nanopartículas, podendo ocorrer o processo de aglomeração caso não haja repulsão estérica entre as mesmas. Caso esse valor seja maior do que o PI, há o surgimento de cargas negativas na superfície. Essas cargas são devido à presença de grupos $\text{Fe}^{(+2,+3)}\text{O}^{-2}$. O aumento do valor do pH até próximo ao extremo (pH ~12) provoca o aumento do número de grupos carregados negativamente e, conseqüentemente, observa-se o potencial zeta atingir valores menores com cada adição da base. Em contrapartida, em soluções cujo valor do pH está abaixo do PI, surge cargas positivas na superfície das nanopartículas. A protonação do óxido dará origem aos grupos $\text{Fe}^{(+2,+3)}\text{OH}_2^+$. No extremo no qual o valor do pH se aproxima de 2, o aumento da acidez do meio provoca o comportamento inverso ao mencionado anteriormente. Agora, a cada adição do ácido, há o aumento do número de grupos protonados e o aumento do potencial zeta. O PI para amostra de nanopartícula sem modificação é 6,9 enquanto que na literatura esse valor é próximo de 7 (100-104). Pode haver variação do PI uma vez que depende de fatores tais como a quantidade de matéria sobre a superfície em questão, preparação e origem da amostra (102).

A amostra NP@MPTS que corresponde às nanopartículas magnéticas funcionalizadas com (3-mercaptopropil)trióxido de silano (MPTS) não foram tituladas. Ambos os eletrodos da célula utilizada para medir o potencial zeta são compostos de ouro devido sua excelente condutividade elétrica. A tendência de o grupo tiol reagir com o ouro poderia comprometer o funcionamento dos eletrodos (105).

A amostra NP@MPTS@POL possui uma camada polimérica que forma uma casca sobre a superfície da nanopartícula. A partir deste momento, as características da superfície da amostra dependem do copolímero. Isso é confirmado com a alteração do valor de PI para próximo de 3,6. O comportamento da curva é devido à repetição de grupos éteres (PEGMA) que compõe a camada mais externa da nanoplateforma. Os grupos éteres possibilitam pontos de hidrólise nesta camada mais externa e, conseqüentemente, o surgimento de grupos ionizáveis que são responsáveis pelo comportamento apresentado na curva (60,106).

Ao condensar (acoplar) a molécula de ácido fólico (amostra NP@MPTS@POL@AF) aos grupos aminos polimerizados à cadeia do copolímero não influenciou significativamente no PI da nanoplateforma. A redução no valor do PI

de 3,6 para 3,1 pode ser atribuído à presença do grupo carboxilato secundário presente no ácido fólico, uma vez que apenas um dos grupos é utilizado na reação ao copolímero. Apesar de haver grupos aminos secundários e terciários também presentes no ácido fólico, um possível impedimento estérico torna estes grupos pouco ativos (71).

Enquanto a titulação potenciométrica fornece informações acerca do potencial zeta ao variar o pH da solução, o diâmetro hidrodinâmico permitiu confirmar o valor de pH no qual ocorre a agregação das nanopartículas. Cada modificação na superfície das nanopartículas configurou características específicas que se comportaram diferente uma das outras. As curvas da variação do diâmetro hidrodinâmico frente às mudanças no valor do pH são apresentadas na **Figura 18**.

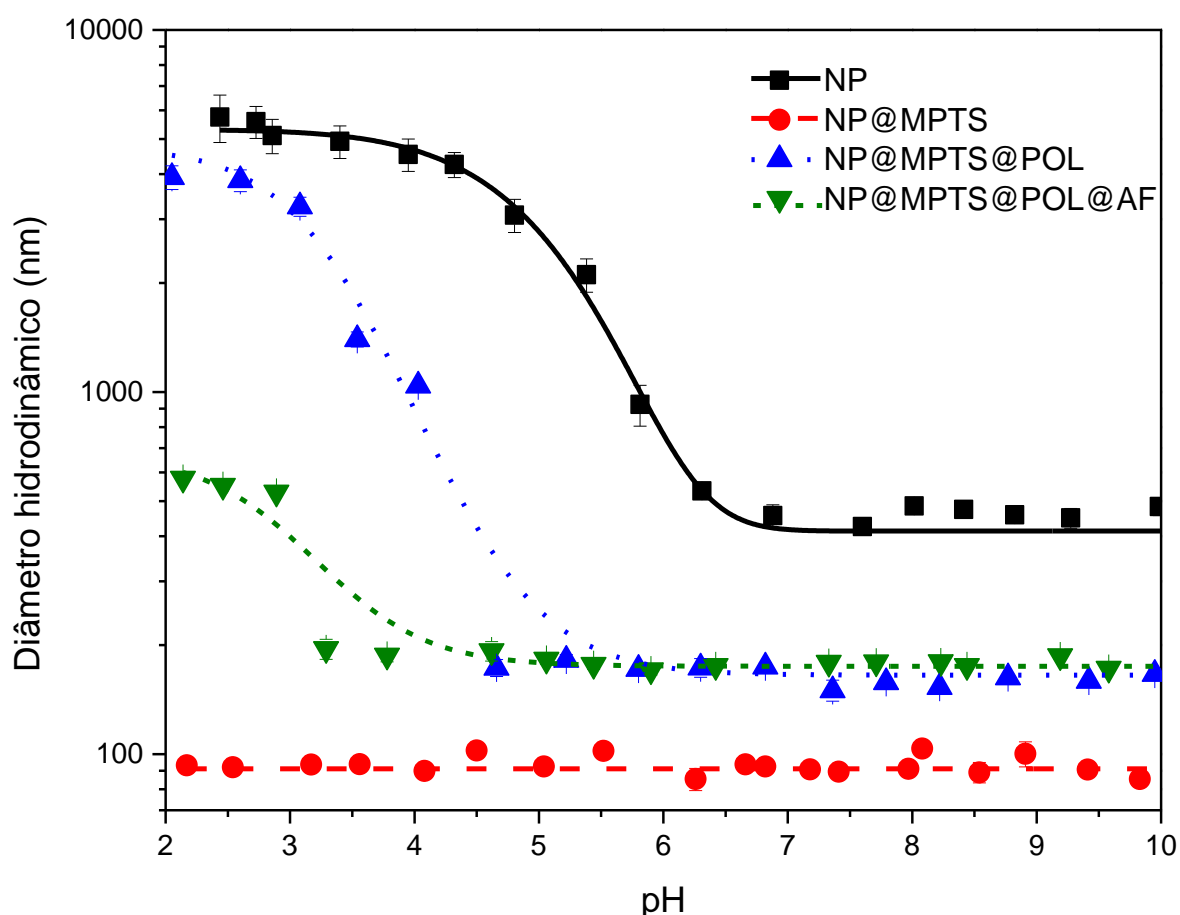


Figura 18 - Gráfico da variação do diâmetro hidrodinâmico em função da mudança do valor de pH da dispersão à 25 °C.

Ao visualizar a curva correspondente à amostra de nanopartículas de óxido de ferro (amostra NP), verifica-se a agregação das mesmas em dispersões cujo valor do

pH do meio está próximo ao ponto isoelétrico. A diminuição do valor do pH promove a desprotonação dos grupos hidroxilas na superfície das nanopartículas. A ausência de carga líquida e a inexistência do impedimento estérico torna a superfície susceptível ao processo de agregação, confirmado pelo aumento drástico do diâmetro hidrodinâmico, reduzindo assim a estabilidade das nanopartículas. A diminuição no valor de pH provoca o aumento do potencial zeta das nanopartículas (aprox. +30 mV em pH 2), conforme observado na **Figura 17**. No entanto, as nanopartículas permanecem aglomeradas mesmo com esse valor de potencial zeta, conforme observado na **Figura 18**. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que o surgimento de carga de superfície não desfaz o aglomerado e sim previne que o aglomerado aumente de tamanho.

A amostra das nanopartículas modificadas com MPTS (amostra NP@MPTS) não apresentou variações significativas no diâmetro hidrodinâmico na faixa de pH estudada. Isso é confirmado pelo comportamento linear da curva que representa a amostra na **Figura 18**. Esta estabilidade conferida pela adição do agente de superfície oferece a vantagem na qual modificações posteriores puderam ser realizadas sem a possibilidade de danificar/impedir as nanopartículas em função do pH do meio.

A adição do copolímero à superfície da nanopartícula (amostra NP@MPTS@POL) a partir da formação da ligação dissulfeto modificou significativamente o aspecto da curva da amostra. Apesar da semelhança com a curva da amostra de nanopartículas sem modificação, o comportamento da amostra não está relacionado à presença de hidroxilas na superfície. A estrutura do copolímero, conforme mencionado, possui diversos grupos éteres (PEGMA) e ésteres (PCL) ao longo da cadeia. Esses grupos na presença de prótons livres, ou seja, em meios cujo valor de pH é baixo, sofre protonação nos átomos de oxigênio e em meios básico, o inverso ocorre. Devido a camada mais externa ser composta pelo PEGMA de baixa massa molecular, ao valor de pH se aproximar do PI, a repulsão estérica não é o suficiente para manter as partículas dispersas (106), possibilitando que essas se agreguem conforme observado o comportamento da curva na **Figura 18**.

Na **Figura 17**, as curvas atribuídas aos comportamentos das amostras NP@MPTS@POL e NP@MPTS@POL@AF são muito similares e se diferenciam em seus respectivos PI. No entanto, ao comparar as curvas de ambas as amostras na **Figura 18**, verifica-se um comportamento diferente. Enquanto há a presença de aglomeração na amostra contendo apenas o polímero em valores de pH próximo ao

PI, a amostra contendo o ácido fólico apresenta menor grau de aglomeração. Esse aspecto pode ser explicado devido ao aumento no impedimento estérico na superfície da nanopartícula, proveniente da polimerização com a 2-propenammina e a adição da molécula de ácido fólico. Essa característica possibilita que a nanoplateforma possa ser administrada oralmente e esta não sofrerá mudanças conformacionais significativas ao ser submetida ao trato digestivo humano.

A distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, semelhante ao potencial zeta, é diretamente influenciado pela identidade e pela quantidade do agente de superfície utilizado na modificação (102). A modificação sucessiva das nanopartículas culminaram inicialmente numa redução no diâmetro das nanopartículas e posteriormente num aumento do diâmetro. Esse comportamento é observado na **Figura 19**.

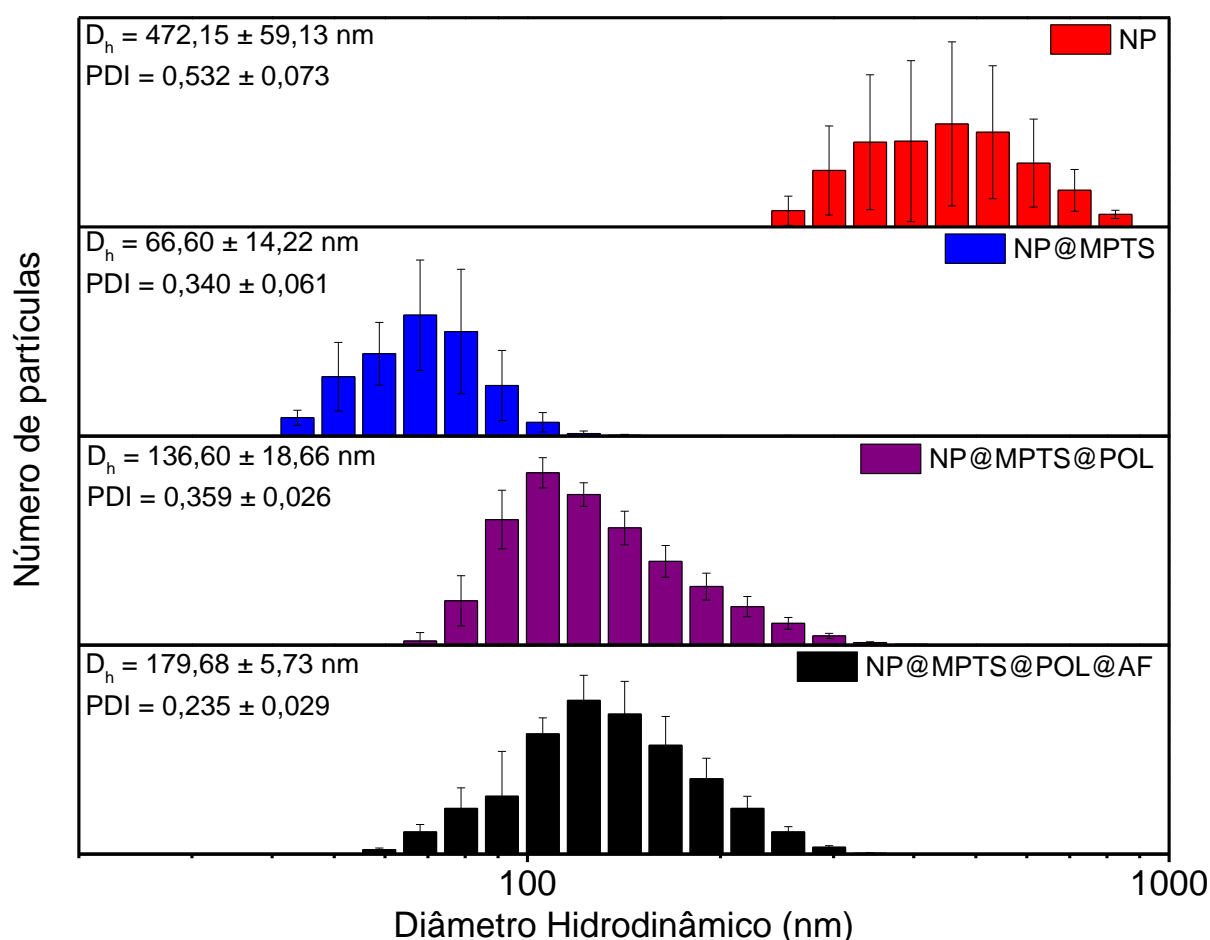


Figura 19 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das amostras de nanopartículas à 25 °C e pH 7,4.

A amostra das nanopartículas puras (amostra NP), isto é, sem funcionalização, devido a sua grande relação área/volume (característica de materiais nanométricos) tende a aglomerar. A energia de superfície desses materiais é dependente da relação área/volume. O mecanismo de aglomeração provoca o aumento do volume dos materiais, porém a relação área/volume diminui. Logo, em decorrer deste mecanismo ocorre uma diminuição da energia de superfície do sistema (107). O diâmetro das nanopartículas é aproximadamente a $472,15 \pm 59,13$ nm com PDI igual a $0,532 \pm 0,073$ em pH igual a 7,4. A grandeza do valor, do desvio e do índice de polidispersão confirmam a existência de aglomerados de diferentes tamanhos contendo múltiplas “famílias” (conjunto de nanopartículas de diâmetros aproximados) (106,108).

A amostra das nanopartículas após a modificação com o agente de superfície MPTS (amostra NP@MPTS), no mesmo valor de pH, possui diâmetro hidrodinâmico aproximadamente 7 vezes menor que a amostra das nanopartículas puras. O diâmetro é aproximadamente $66,60 \pm 14,22$ nm com PDI igual a $0,340 \pm 0,061$. Os grupos siloxanos e o grupo tiol que compõem o MPTS conferem maior repulsão eletrostática entre as nanopartículas (e dessa forma maior estabilidade), reduzindo o processo de aglomeração, porém sem evita-lo totalmente (59). No entanto, não é possível afirmar se há uma camada de MPTS individual para cada nanopartícula ou se há um aglomerado de nanopartículas modificadas com MPTS (102,109).

O copolímero na superfície da nanopartícula (amostra NP@MPTS@POL) através da ligação dissulfeto promove o aumento do diâmetro hidrodinâmico da amostra. O valor agora passa a ser $136,60 \pm 18,66$ nm com PDI $0,359 \pm 0,026$. Diferentemente do MPTS, o copolímero é uma molécula de alta massa molecular, responsável por quase dobrar o diâmetro hidrodinâmico. O leve aumento no desvio padrão e no índice de polidispersão pode ser explicado com base na mudança do tipo de repulsão entre as nanopartículas. A repulsão, que anteriormente era eletrostática proveniente do agente de superfície, passa a ter maior caráter estérico do que eletrostáticos. Isso ocorrer devido as longas cadeias carbônicas lineares que se localizam paralelas entre si e perpendiculares à superfície das nanopartículas.

Ao polimerizar o grupo metacrilato presente no final da cadeia carbônica do copolímero com 2-propenamina e, posteriormente, modificar os grupos aminos com ácido fólico (amostra NP@MPTS@POL@AF) provocou um aumento da cadeia do copolímero como um todo. Essa modificação, conseqüentemente, culminou no aumento diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. O diâmetro hidrodinâmico médio

das nanopartículas magnéticas ao final das modificações estruturais é $179,68 \pm 5,73$ nm com PDI $0,235 \pm 0,029$. Apesar do aumento de aproximadamente 30 nm no diâmetro das nanopartículas, houve a redução do índice de polidispersão das mesmas. Isto significa que a adição da molécula de ácido fólico reduziu o surgimento de múltiplas “famílias” (aglomerados com diferentes diâmetros), possibilitando melhor controle do tamanho na obtenção das nanoplateformas (69-71).

4.5. Eficiência de incorporação e perfil de liberação do fármaco MTX

A espectroscopia UV-Vis foi utilizada a fim de averiguar a eficiência de incorporação do metotrexato nas nanopartículas híbridas. Inicialmente, o espectro de absorvância obtido permitiu identificar três bandas principais características do fármaco em 258, 303 e 371 nm. A **Figura 20** apresenta o espectro de absorvância do fármaco Metotrexato. As bandas abaixo de 250 nm estão no limite inferior da faixa espectral do equipamento, logo optou-se pela banda em 303 nm para a análise quantitativa, uma vez que possui a maior intensidade e, portanto, maior absorvância. As curvas analíticas obtidas, compreendendo concentrações do fármaco entre 0 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, são apresentadas na **Figura 21.A** com destaque para a curva específica no comprimento de onda de 303 nm apresentada na **Figura 21.B** cujo valor de absorvância molar obtido foi de $0,0304 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9972.

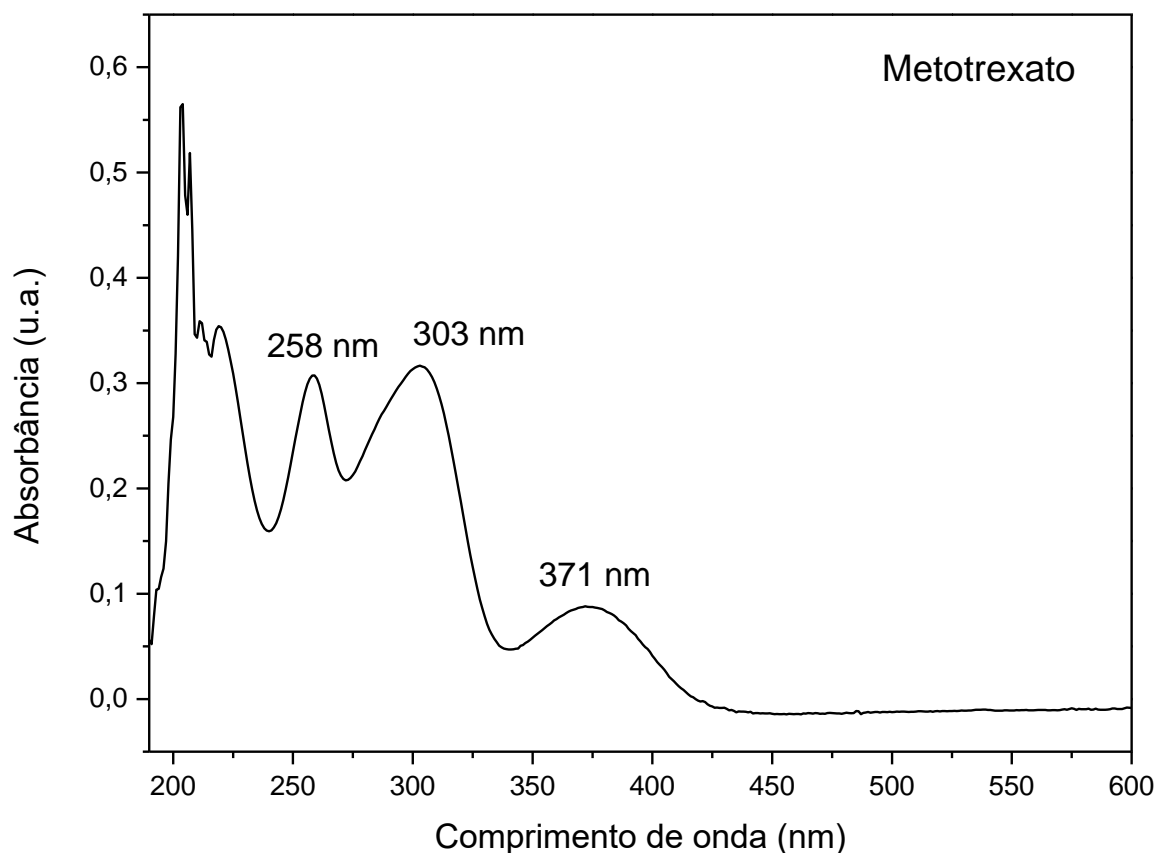


Figura 20 - Espectro de absorvância do fármaco metotrexato na região do UV-Vis.

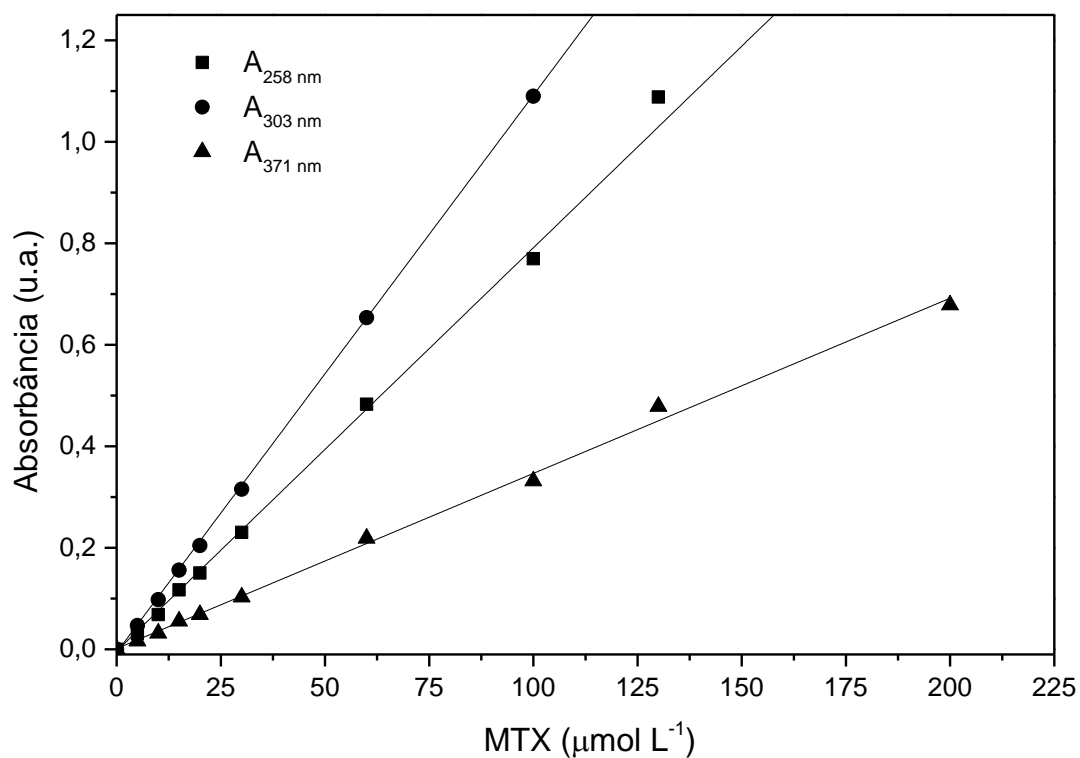


Figura 21.A - Curvas analíticas para o metotrexato nos comprimentos de onda 258, 303 e 371 nm.

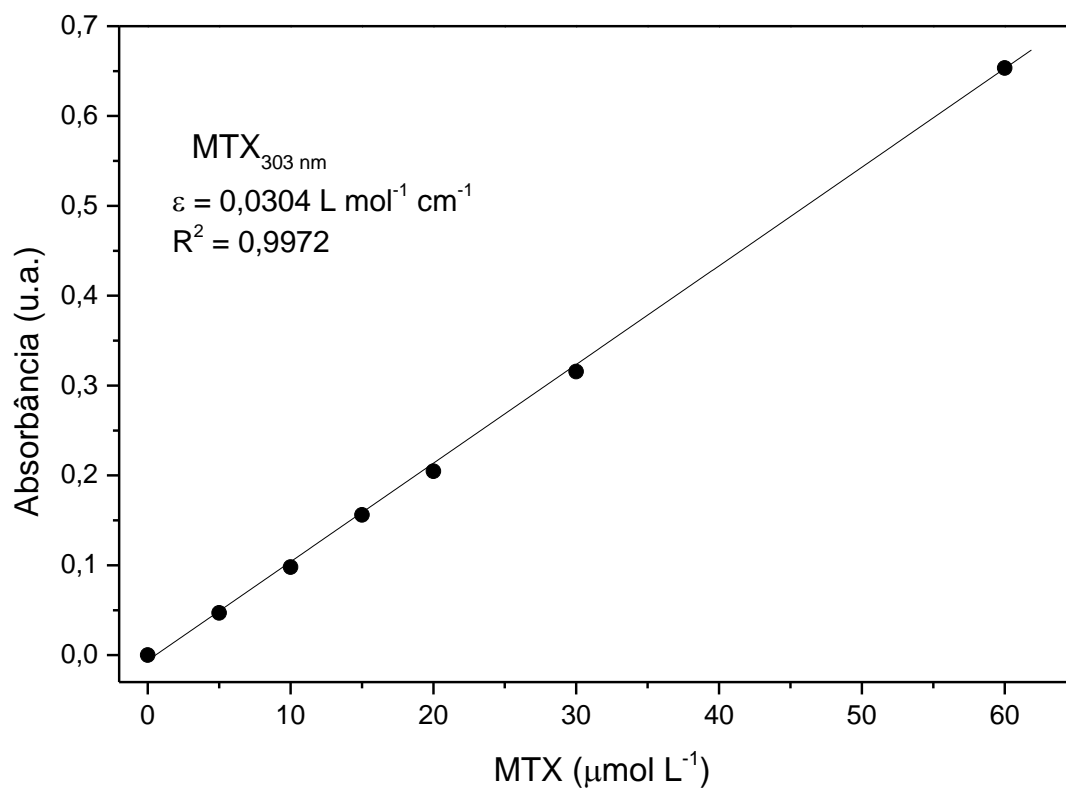


Figura 21.B - Curva analítica para o metotrexato no comprimento de onda 303 nm.

A hidrofobicidade do metotrexato caracteriza sua baixa solubilidade em água, permitindo atribuir a incorporação do fármaco às interações com o segmento hidrofóbico do copolímero (PCL) presente na superfície da nanopartícula. Foi avaliado a eficiência de incorporação do fármaco partindo de três quantidades distintas de metotrexato. A **Tabela 3** resume os valores obtidos para eficiência de incorporação e teor de metotrexato para cada amostra. É observado que a eficiência de incorporação do fármaco aumenta ao adicionar mais metotrexato na dispersão, atingindo uma eficiência próxima a 96,00% utilizando 17,50 mg de fármaco. O teor de metotrexato incorporado também aumenta com a adição de mais fármaco, atingindo o valor máximo de 35,78 %. Para o estudo de liberação, foi considerado a proporção com maior eficiência de metotrexato incorporado.

Tabela 3 - Influência da variação na proporção em massa fármaco:matriz na eficiência de incorporação do metotrexato.

Massa da matriz (mg)	Massa MTX inicial (mg)	Proporção em massa fármaco:matriz (%)	Massa MTX incorporada* (mg)	Teor de MTX* (%)	Eficiência de Incorporação* (%)
35,00	1,00	3	0,72 ± 0,01	2,34 ± 0,01	71,87 ± 0,39
	7,00	20	6,13 ± 0,22	16,97 ± 0,49	87,58 ± 3,08
	17,50	50	16,72 ± 0,70	35,78 ± 0,97	95,54 ± 3,98

* Valores médios apresentados com os respectivos desvios padrão para um número de 3 amostras.

A **Figura 22** apresenta o perfil de liberação das amostras de nanopartículas híbridas. Nesta figura é possível observar a influência do meio dispersante na liberação do metotrexato através de duas variáveis: pH e presença de redutor (glutathiona reduzida - GSH). Todas as amostras foram analisadas durante 96 horas, no qual foram retiradas alíquotas de 1 em 1 hora nas primeiras 12 horas de análise e, posteriormente, de 12 em 12 horas até que o perfil de liberação atingisse um patamar, indicando que cessou a liberação do fármaco. A amostra cujo meio utilizado foi apenas o tampão fosfato (pH 7,4) apresentou rápida liberação, atingindo 15,88% de liberação nas primeiras 12 horas de análise e o total de 24,35% ao final das 96 horas de análise. A amostra que também está dispersa em tampão fosfato (pH 7,4) e na presença de

glutathione reduzida (10 mM) (110,111) apresentou maior porcentagem de liberação quando comparada à amostra ausente de glutathione. Esta apresentou rápida liberação nas primeiras 12 horas, atingindo 28,16% de liberação e, dessa forma, superando a amostra ausente de GSH ao longo das 96 horas (24,35%). Ao final das 96 horas, atingiu aproximadamente 47,00% de liberação, quase o dobro da amostra ausente de GSH no mesmo período de tempo analisado. A diferença nos valores citados comprova a ação da GSH no rompimento da ligação dissulfeto presente entre a nanopartícula e a camada polimérica em sua superfície. A amostra cuja liberação foi realizada na presença do simulado de fluido gástrico (pH 2) apresentou a menor porcentagem de liberação em comparação as demais amostras, atingindo aproximadamente 10,00% de liberação após as 96 horas de análise. A baixa porcentagem de liberação em valores de pH próximo ao encontrado no estômago humano possibilita o processo de absorção pela mucosa intestinal sem perdas significativas do fármaco incorporado. Dessa forma, é possível afirmar que a plataforma é menos ativa em valores de pH baixos quando comparado ao valor de pH encontrado na corrente sanguínea. Ambas as amostras em pH 7,4 apresentaram elevada liberação nas primeiras horas de análise e este comportamento pode ser atribuído as interações fracas com o segmento PEGMA do copolímero (*burst effect*), apesar do fármaco apresentar característica hidrofóbica e possuir fortes interações com o segmento PCL do copolímero. A liberação do metotrexato ocorre à medida que o copolímero é degradado pelo organismo (112).

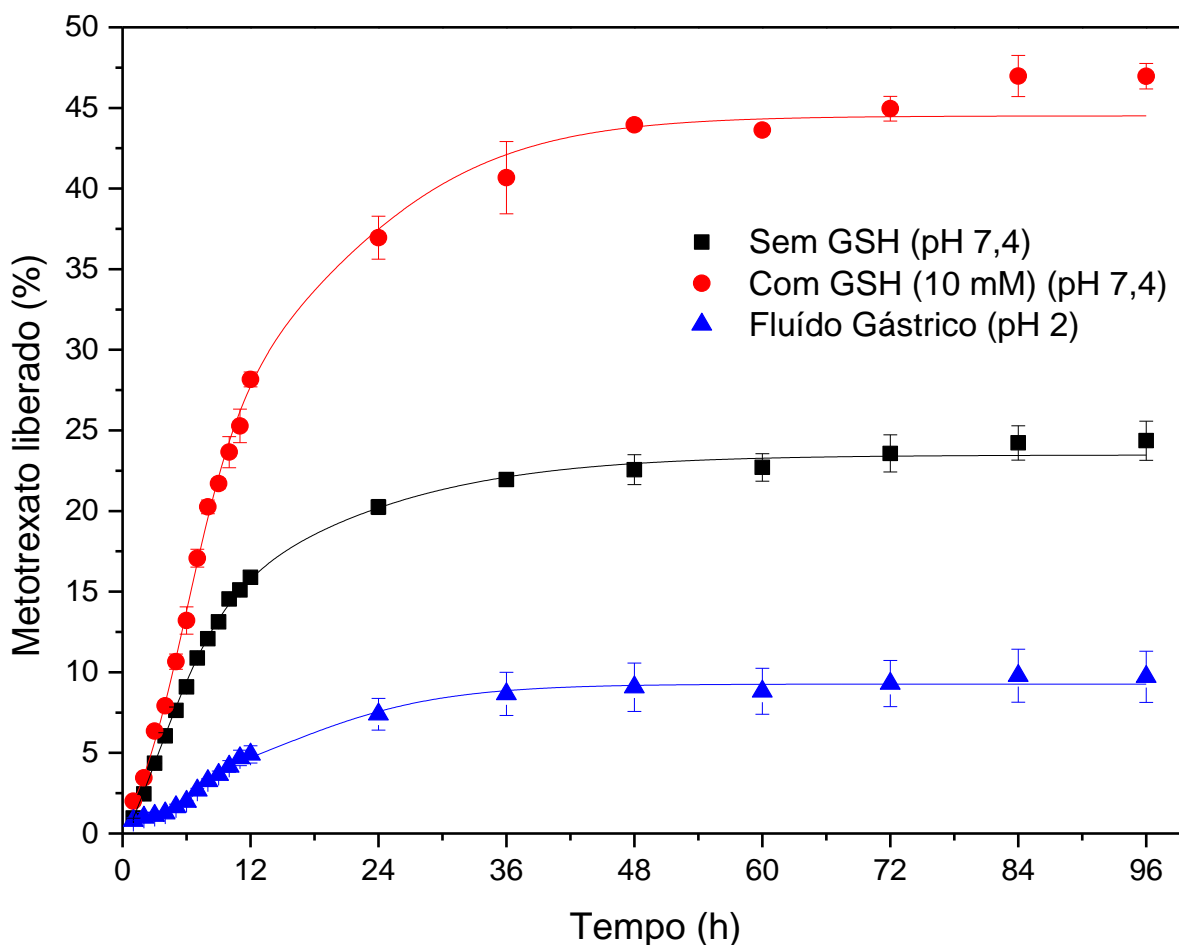


Figura 22 - Perfil de liberação de metotrexato das amostras de nanopartículas na presença e ausência de glutatona reduzida (GSH) em tampão fosfato (pH 7,4) e simulado de flúido gástrico (pH 2).

A utilização do modelo de Peppas (113) permitiu elucidar o mecanismo na etapa inicial de liberação do metotrexato, no qual foi determinado o expoente de liberação (n) e a constante cinética (k). O gráfico da fração de liberação em função do tempo pode ser observado na **Figura 23** e os parâmetros determinados nesta curva compõe a **Tabela 4**. A etapa inicial se estende do momento inicial da análise ao tempo no qual a porcentagem de liberação atinge 60 % do valor máximo liberado, no qual o modelo de Peppas é válido e os valores de coeficiente de correlação apresentam valores superiores a 0,98. Como a amostra analisada em simulado de flúido gástrico apresentou um retardo para o início da liberação, optou-se por aplicar o modelo de Peppas após 3 horas do início da análise. Os valores do expoente de liberação obtidos pela linearização das curvas estão compreendidos entre 1,10 e 1,20 para as amostras de nanopartículas, que, para plataformas de liberação esféricas, deve ser interpretado

como liberação de ordem zero, segundo Peppas et al (114). Este resultado corrobora com o perfil de liberação, pois estima-se que a liberação lenta do metotrexato está relacionado com as interações com o seguimento hidrofóbico do copolímero na superfície da nanopartícula, sendo necessário relaxação e/ou degradação das cadeias poliméricas para liberação do metotrexato.

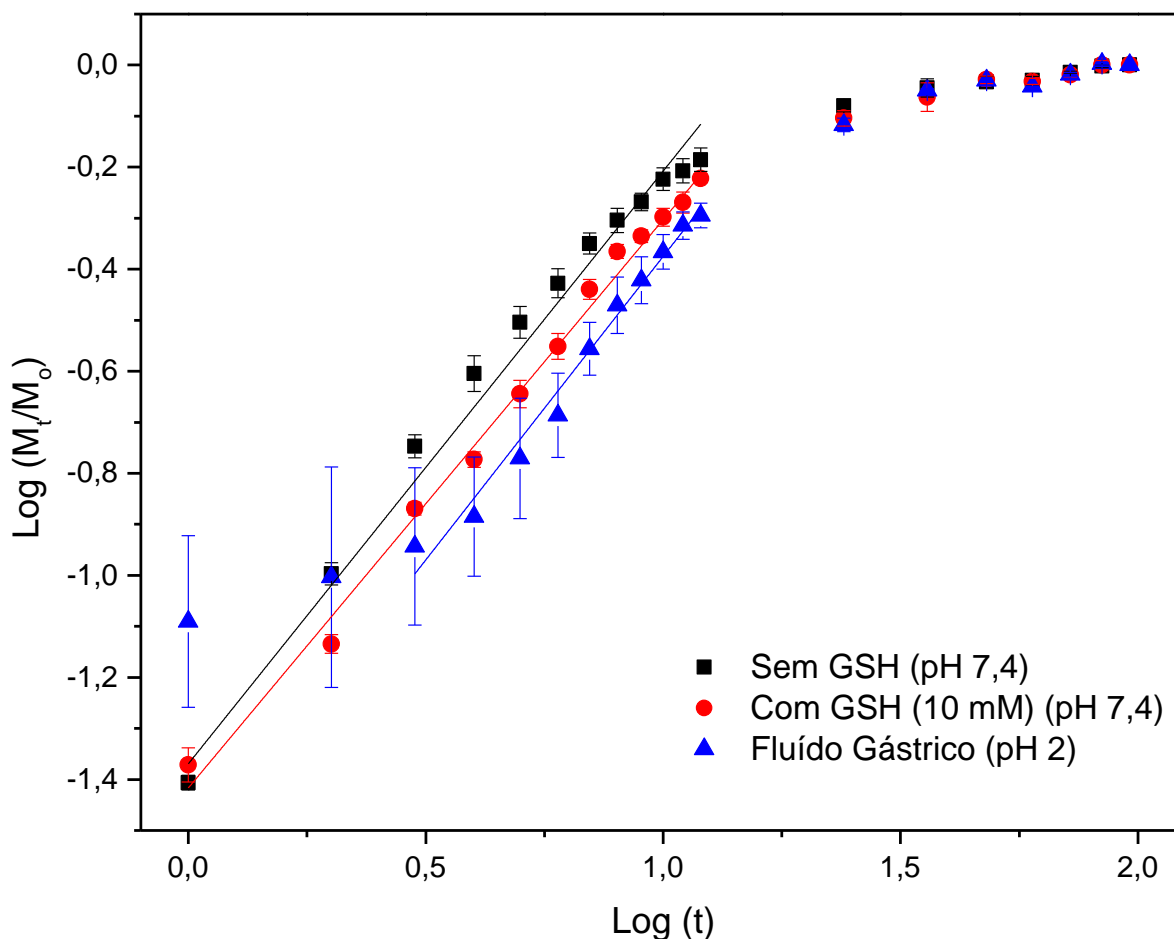


Figura 23 - Curva bi-logarítmica da fração de metotrexato liberado em função do tempo.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos da curva cinética de liberação de metotrexato das nanopartículas híbridas.

Amostra	n	k (h ⁻¹)	R ²
Sem GSH (pH 7,4)	1,16	0,043	0,991
Com GSH (10 mM) (pH 7,4)	1,11	0,038	0,994
Flúido gástrico (pH 2)	1,19	0,027	0,983

5. Conclusões.

A rota sintética proposta para a obtenção da nanoplataforma híbrida composta de um caroço inorgânico (Fe_3O_4 – magnetita) e casca orgânica (HS-PCL-co-PEGMA-NH-AF) foi empregada com sucesso. A síntese das nanopartículas de óxido de ferro e a fase magnetita foram confirmadas através das técnicas FTIR e DRX, respectivamente. A característica magnética foi observada com base no comportamento da dispersão de nanopartículas de magnetita na presença de um imã de bancada. A síntese do copolímero PCL-co-PEGMA e suas posteriores modificações foram confirmadas através das técnicas FTIR e RMN ^1H enquanto a distribuição da massa molecular das amostras obtidas por GPC confirmaram o aumento na média da massa molecular da cadeia do copolímero com as modificações. A adição da casca copolimérica ao caroço inorgânico foi confirmada principalmente por FTIR e corroborada com as informações obtida através da caracterização coloidal. Foi possível identificar que a casca polimérica compõe aproximadamente 60% da massa da nanopartícula, enquanto o caroço de magnetita e a água adsorvida compõe os 40% restantes.

Foram obtidas nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico em torno de 180 nm estáveis em pH fisiológico (7,4) e a ausência do processo acentuado de aglomeração na faixa de pH estudado possibilita sua aplicação em diferentes regiões do corpo humano. As nanopartículas apresentaram elevada eficiência de incorporação, atingindo aproximadamente 96% de eficiência quando utilizado uma proporção em massa matriz:fármaco de 1:1. O perfil de liberação possibilitou identificar que a nanoplataforma é menos ativa em valores de pH próximo 2 (valor de pH encontrado no fluido gástrico estomacal) enquanto a presença da glutatona reduzida intensificou a liberação do metotrexato, atingindo quase 50% de liberação do metotrexato após 96 horas (4 dias) de análise. O modelo de Peppas foi utilizado para elucidar o mecanismo de liberação e sua confiabilidade confirmada pelos valores do coeficiente de correlação ($> 0,98$), mostrando que a liberação do metotrexato depende da relaxação e/ou degradação do copolímero. Os dados apresentados nessa dissertação permitem identificar a nanoplataforma sintetizada como potencial candidata à sistemas de liberação controlada.

6. Perspectivas

Os itens listados abaixo podem ser considerados como guias para a continuação deste trabalho.

- Quantificar as modificações realizadas na cadeia do copolímero;
- Otimizar a rota sintética com base nos resultados da quantificação das modificações;
- Avaliar a liberação de outros fármacos, tanto hidrofóbicos e hidrofílicos, possivelmente simultaneamente em outros meios de dissolução (ex: plasma sanguíneo);
- Testar a biocompatibilidade do biomaterial (testes *in vivo*).

7. Referências

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **World cancer report 2014**. Lyon (FR), 2014. 632 p.
- 2 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016. 124 p.
- 3 LONGO, D. L. Approach to the patient with cancer. In: LONGO, D. L. et al. (Ed.). **Harrison's principles of internal medicine**. 19th ed. New York: McGraw-Hill Education, 2015. Part. 7, sect. 1, chap. 99, p. 467-475.
- 4 WU, G. et al. Overcoming treatment resistance in cancer: current understanding and tactics. **Cancer Letters**, vol. 387, p. 69-76, 2016.
- 5 LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology**, vol. 205, p. 275-292, 2005.
- 6 DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, vol. 740, p. 364-378, 2014.
- 7 PARK, K. Controlled drug delivery systems: past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, vol. 190, p. 3-8, 2014.
- 8 BRAMBILLA, D.; LUCIANI, P.; LEROUX, J-C. Breakthrough discoveries in drug delivery technologies: the next 30 years. **Journal of Controlled Release**, vol. 190, p. 9-14, 2014.
- 9 BERTRAND, N.; LEROUX J-C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release**, vol. 161, p. 152-163, 2012.
- 10 HERVAULT, A.; THANH, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. **Nanoscale**, vol. 6, p. 11553-11573, 2014.
- 11 VURAL, I.; SARISOZEN, C.; OLMEZ, S. S. Chitosan coated furosemide liposomes for improved bioavailability. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, vol. 7, p. 426-430, 2011.
- 12 WANG, X. et al. Synthesis, characterization and liver targeting evaluation of self-assembled hyaluronic acid nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 96, p. 255-262, 2017.
- 13 DÜNNHAUPT, S. et al. Thiolated nanocarriers for oral delivery of hydrophilic macromolecular drugs. **Carbohydrate Polymers**, vol. 117, p. 577-584, 2015.

14 HENEWEER, C.; GENDY, S. E. M.; PEÑATE-MEDINA, O. Liposomes and inorganic nanoparticles for drug delivery and cancer imaging. **Therapeutic Delivery**, vol. 3, p. 645-656, 2012.

15 LIU, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 60, p. 1650-1662, 2008.

16 PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

17 LIMA-TENÓRIO, M. K. et al. Magnetic nanoparticles: *in vivo* cancer diagnosis and therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, p. 313-327, 2015.

18 HERVAULT, A. et al. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. **Nanoscale**, v. 6, p. 11553-11573, 2014.

19 KALEDOVÁ, A.; VESELÝ, D.; BRODINOVÁ, J. Anticorrosive spinel-type pigments of the mixed metal oxides compared to metal polyphosphates. **Anti-corrosion Methods and Materials**, v. 51, p. 6-17, 2004.

20 PILLAI, V.; SHAH, D. O. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite particles using water-in-oil microemulsions. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 163, p. 243-248, 1996.

21 SHAFI, K. V. P. M.; GEDANKEN, A. Sonochemical approach to the preparation of barium hexaferrite nanoparticles. **Nanostructured Materials**, v. 12, p. 29-34, 1999.

22 ZHANG, S. et al. Preparation of core shell particles consisting of cobalt ferrite and silica by sol-gel process. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 415, p. 257-260, 2006.

23 KIM, Y. I. et al. Synthesis and characterization of CoFe_2O_4 magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physica B: Condensed Matter**, v. 337, p. 42-51, 2003.

24 HUANG, J. et al. Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles. **Theranostics**, v. 2, p. 86-102, 2012.

25 WANG, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 1, p. 35-40, 2011.

26 NICOLAS J. et al. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, p. 1147-1235, 2013.

27 GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, vol. 26, p. 3995-4021, 2005.

- 28 XIONG, X. et al. Amphiphilic block co-polymers: preparation and application in nanodrug and gene delivery. **Acta Biomaterialia**, vol. 8, p. 2017-2033, 2017.
- 29 WEI, X. et al. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 381, p. 1-18, 2009.
- 30 WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, vol. 35, p. 1217-1256, 2010.
- 31 LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, vol. 38, p. 3484-3504, 2009.
- 32 KHANNA, A. et al. Molecular modeling studies of poly lactic acid initiation mechanisms. **Journal of Molecular Modeling**, vol. 24, p. 367-374, 2008.
- 33 OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 64, p. 246-255, 2012.
- 34 HERRERO, E. P.; ALONSO, M. J.; CSABA, N. Polymer-based oral peptide nanomedicines. **Therapeutic Delivery**, vol. 3, p. 657-668, 2012.
- 35 NAJAFABADI, R. E. et al. Using superparamagnetic iron oxide nanoparticles to enhance bioavailability of quercetin in the intact rat brain. **BMC Pharmacology and Toxicology**, vol. 19, p. 1-12, 2018.
- 36 YUN, Y.; CHO, Y. W.; PARK, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 65, p. 822-832, 2013.
- 37 RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, vol. 116, p. 1-27, 2006.
- 38 BANIK, B.L.; FATTAHI, P.; et al. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, p. 271–299, 2016.
- 39 DIAS, A.M.G.C.; HUSSAIN, A.; et al. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 142–55, 2011.
- 40 BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol 66, p. 2-25, 2014.
- 41 JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 7, p. 653-664, 2010.

- 42 BATES, D.O. et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Journal of Anatomy**, vol. 200, p. 581-597, 2002.
- 43 CHENG, Z. et al. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. **Science**, vol. 338, p. 903-910, 2012.
- 44 RUSSELL-JONES, G. et al. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 98, p. 1625-1633, 2004.
- 45 DUNN, S. S. et al. Generating better medicines for cancer. **ACS Macro Letters**, vol. 2, p. 393-397, 2013.
- 46 REINEKE, T. M. Stimuli-responsive polymers for biological detection and delivery. **ACS Macro Letters**, vol. 5, p. 14-18, 2016.
- 47 KARAMI, Z. et al. Naproxen conjugated mPEG–PCL micelles for dual triggered drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, vol. 61, p. 665-673, 2016.
- 48 MENG, F.; HENNINK, W. E.; ZHONG, Z. Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. **Biomaterials**, vol. 30, p. 2180-2198, 2009.
- 49 HUANG, H. et al. Fabrication and reduction-sensitive behavior of polyion complex nano-micelles based on PEG-conjugated polymer containing disulfide bonds as a potential carrier of anti-tumor paclitaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 110, p. 59-65, 2013.
- 50 SUN H. et al. Biodegradable micelles with sheddable poly(ethylene glycol) shells for triggered intracellular release of doxorubicin. **Biomaterials**, vol. 30, p. 6358-6366, 2009.
- 51 KRUGER, N. J.; SCHAEWEN, A. V. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 6, p. 236-246, 2003.
- 52 ZHU, Y. et al. Exogenous vitamin C boosts the antitumor efficacy of paclitaxel containing reduction-sensitive shell-sheddable micelles in vivo. **Journal of Controlled Release**, vol. 250, p. 9-19, 2017.
- 53 KHAN, Z. A.; TRIPATHI, R.; MISHRA, B. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. **Expert Opinion on Drug Delivery**, vol. 9, p. 151-169, 2012.
- 54 ZHU, L. et al. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 370, p. 136-143, 2009.

55 WONG, P.; CHOI, S. Mechanisms and implications of dual-acting methotrexate in folate-targeted nanotherapeutic delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 16, p. 1772-1790, 2015.

56 CRONSTEIN, B. N. Methotrexate and its mechanism of action. **Arthritis & Rheumatology**, vol. 39, p. 1951-1960, 1996.

57 HOWARD S. C. et al. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. **The Oncologist**, vol. 21, p. 1-12, 2016.

58 MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acid media. **IEE Transactions on Magnetics**, vol. 17, p. 1247-1248, 1981.

59 KRAUS, A. et al. Synthesis of MPTS-modified cobalt ferrite nanoparticles and their adsorption properties in relation to Au (III). **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 338, p. 359-365, 2009.

60 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.

61 KANAZAWA, T. et al. Development of cell-penetrating peptide-modified mPEG-PCL deblock copolymeric nanoparticles for systemic gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 396, p. 229-238, 2010.

62 KIM, E. et al. Synthesis of gold nanorod-embedded polymeric nanoparticles by a nanoprecipitation method for use as photothermal agents. **Nanotechnology**, vol. 20, p. 1-7, 2009.

63 MASTEROVA, M. N. et al. Polymerization of allylamines in the presence of protonic acid. **Polymer Science U.S.S.R.**, vol. 18, p. 2234-2242, 1976.

64 ZUBOV, V. P. et al. Reactivity of allyl monomers in radical polymerization. **Journal of Macromolecules Science: Part A – Chemistry**, vol. 13, p. 111-131, 1979.

65 POHL, K.; RODRIGUEZ, F. Adiabatic polymerization of acrylamide using a persulfate-bisulfite redox couple. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 26, p. 611-618, 1980.

66 LIN, H-R. Solution polymerization of acrylamide using potassium persulfate as an initiator: Kinetics studies, temperature and pH dependence. **European Polymer Journal**, vol. 37, p. 1507-1510, 2001.

67 BEYLERIAN, N. M. et al. Kinetics and mechanism of potassium persulfate decomposition in aqueous solutions studied by a gasometric method. **Macromolecular Chemistry and Physics**, vol. 203, p. 212-218, 2002.

68 ZHAO, D. et al. Effect and mechanism of persulfate activated by different methods for PAHs removal in soil. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 254-255, p. 228-235, 2013.

69 AKAL, Z. U.; ALPSOY, L.; BAYKAL, A. Superparamagnetic iron oxide conjugated with folic acid and carboxylated quercetin for chemotherapy applications. **Ceramics International**, vol. 42, p. 9065-9072, 2016.

70 LI, J. et al. Polyethyleneimine-mediated synthesis of folic acid-targeted iron oxide nanoparticles for *in vivo* tumor MR imaging. **Biomaterials**, vol. 34, p. 8382-8392, 2013.

71 SHAH, S. A. et al. PEG-coated folic acid-modified superparamagnetic $MnFe_2O_4$ nanoparticles for hyperthermia therapy and drug delivery. **Materials Chemistry and Physics**, vol. 138, p. 703-708, 2013.

72 ZHANG, Z. Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 18, p. 5528-5534, 2010.

73 KRAIS, A. et al. Targeted uptake of folic acid-functionalized iron oxide nanoparticles by ovarian cancer cells in the presence but not in the absence of serum. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, vol. 10, p. 1421-1431, 2014.

74 SADHASIVAM, A. et al. Carbon encapsulated iron oxide nanoparticles surface engineered with polyethylene glycol-folic acid to induce selective hyperthermia in folate over expressed cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 480, p. 8-14, 2015.

75 WANG, S.; LOW, P. S. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. **Journal of Controlled Release**, vol. 53, p. 39-48, 1998.

76 BERNKOP-SCHNURCH, A.; KAST, C. E. Thiolated polymers – thiomers: development and *in vitro* evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates. **Biomaterials**, vol. 22, p. 2345-2352, 2001.

77 BERNKOP-SCHNURCH, A. et al. *In situ* gelling properties of chitosan-thioglycolic acid conjugate in the presence of oxidizing agents. **Biomaterials**, vol. 30, p. 6151-6157, 2009.

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

79 DENG, H. et al. PEG-*b*-PCL copolymer micelles with the ability of pH-controlled negative-to-positive charge reversal for intracellular delivery of doxorubicin. **Biomacromolecules**, vol. 15, p. 4281-4292, 2014.

- 80 CHAN, K. L. A.; HAMMOND, S. V.; KAZARIAN, S. G. Applications of attenuated total reflection infrared spectroscopy imaging to pharmaceutical formulations. **Analytical Chemistry**, vol. 75, p. 2140-2146, 2003.
- 81 MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcester-shire, 2004. 269 p. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/>>. Acesso em: 16 jun. 2018.
- 82 DANAFAR, H. et al. Biodegradable m-PEG/PCL core-shell micelles: preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin. **Advanced pharmaceutical bulletin**, vol. 4, p. 501-510, 2014.
- 83 GONG, C. et al. Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 365, p. 89-99, 2009.
- 84 COUNG, N-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**, vol. 117, p. 3694-3703, 2010.
- 85 ZHOU, S.; DENG, X.; YANG, H. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system. **Biomaterials**, vol. 24, p. 3563-3570, 2003.
- 86 BEGUM, R.; MATSUURA, H. Conformational properties of short poly(oxyethylene) chains in water studied by IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, vol. 93, p. 3839-3848, 1997.
- 87 PLYLAHAN, N. et al. Enhanced electrochemical performance of Lithium-ion batteries by conformal coating of polymer electrolyte. **Nanoscale Research Letters**, vol. 9, p. 1-8, 2014.
- 88 KHOEE, S.; BAGHERI, Y.; HASHEMI, A. Composition controlled synthesis of PCL-PEG Janus nanoparticles: magnetite nanoparticles prepared from one-pot photo-click reaction. **Nanoscale**, vol. 7, p. 4134-4148, 2015.
- 89 CARROT, G. et al. Two general methods for the synthesis of thiol-functional polycaprolactones. **Macromolecules**, vol. 32, p. 5264-5269, 1999.
- 90 SUN, H. et al. Biodegradable micelles with sheddable poly(ethylene glycol) shells for triggered intracellular release of doxorubicin. **Biomaterials**, vol. 30, p. 6358-6366, 2009.
- 91 CUI, C. et al. Reduction-sensitive micelles with sheddable PEG shells self-assembled from a Y-shaped amphiphilic polymer for intracellular doxorubicin release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 129, p. 137-145, 2015.
- 92 ZHANG, H. et al. Redox-sensitive micelles assembled from amphiphilic mPEG-PCL-SS-DTX conjugates for the delivery of docetaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 142, p. 89-97, 2016.

- 93 YANG, X. et al. Folate-functionalized polymeric micelles for tumor targeted delivery of a potent multidrug-resistance modulator FG020326. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, vol. 86, p. 48-60, 2007.
- 94 REZAEI, S. J. T. et al. Folate-decorated thermoresponsive micelles based on star-shaped amphiphilic block copolymers for efficient intracellular release of anticancer drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 437, p. 70-79, 2012.
- 95 LI, X.; MCTAGGART, M.; MALARDIER-JUGROOT, C. Synthesis and characterization of a pH responsive folic acid functionalized polymeric drug delivery system. **Biophysical Chemistry**, vol. 214-215, p. 17-26, 2016.
- 96 ZHANG, S. et al Thiol modified $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ as a robust, high effective, and recycling magnetic sorbent for mercury removal. **Chemical Engineering Journal**, vol. 226, p. 30-38, 2013.
- 97 WEBSTER, F. X.; SILVERSTEIN, R. M. Infrared Spectroscopy. In: _____. **Spectroscopy identification of organic compounds**. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. Cap. 3, p. 71-143.
- 98 ZHANG, J. et al. On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, vol. 4, p. 40-48, 2008.
- 99 BOGDANOV, B. et al. Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) copolymers. **Polymer**, vol. 39, p. 1631-1636, 1998.
- 100 SUN, Z-X. et al. Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 197, p. 151-159, 1998.
- 101 BERG, J. M. et al. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to *in vitro* toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, p. 276-283, 2009.
- 102 BINI, R. A. et al. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, vol. 324, p. 534-539, 2012.
- 103 LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, vol. 108, p. 2064-2110, 2008.
- 104 PARKS, G. A. The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems. **Chemical Reviews**, vol. 65, p. 177-198, 1965.
- 105 HAKKINEN, H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. **Nature Chemistry**, vol. 4, p. 443-455, 2012.

- 106 VIALI, W. R. et al. PEGylation of SPIONs by polycondensation reactions: a new strategy to improve colloidal stability in biological media. **Journal of Nanoparticle Research**, vol. 15, p. 1-14, 2013.
- 107 SHAW, D. J. **Introdução à química dos coloides e de superfícies**. Trad.: MAAR, J. H. 1^a ed. São Paulo: Editora Blucher, 1975. 185 p.
- 108 CORNEL, R. M.; SCHWERTMANN, U. Surface chemistry and colloidal stability. In: CORNEL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **Iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. Cap. 10, p. 221-252.
- 109 WU, Z. et al. Preparation of uniform Au@SiO₂ particles by direct silica coating on citrate-capped Au nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 392, p. 220-224, 2011.
- 110 ORTEGAS, A. L.; MENA, S.; ESTRELA, J. M. Glutathione in câncer cell death. **Cancers**, vol. 3, p. 1285-1310, 2011.
- 111 BALENDIRAN, G. K.; DABUR, R.; FRASER, D. The role of glutathione in cancer. **Cell Biochemistry and Function**, vol. 22, p. 343-352, 2004.
- 112 KARAMI, Z. et al. Naproxen conjugated mPEG-PCL micelles for dual triggered drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 61, p. 665-673, 2016.
- 113 SCIENCES, H. et al. Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery System. **Acta Polonic Pharmacologica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.
- 114 RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23-36, 1987.