



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

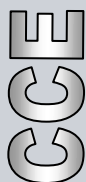
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICROESFERAS TERMOSENSÍVEIS E  
MAGNÉTICAS, À BASE DE PECTINA, PARA  
APLICAÇÃO DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE CURCUMINA”.**

Dissertação apresentada por *Elizângela Aparecida Messias Soares de Almeida* ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.



**Centro de  
Ciências Exatas**

*Maringá, agosto de 2013.*

**Elizângela Aparecida Messias Soares de Almeida**

**Síntese e caracterização de microesferas termossensíveis  
e magnéticas, à base de pectina, para aplicação de liberação  
controlada de curcumina.**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Estadual de Maringá, como  
como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Mestre em Química.  
Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz

MARINGÁ  
2013

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)**

A447s Almeida, Elizângela Aparecida Messias Soares de  
Síntese e caracterização de microesferas  
termossensíveis e magnéticas, à base de pectina  
para aplicação de liberação controlada de curcumina  
/ Elizângela Aparecida Messias Soares de Almeida. --  
Maringá, 2013.  
129 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Departamento de Química, Programa de Pós-  
Graduação em Química, 2013.

1. Microesferas 2. Pectina. 3. Anidrido maleico.  
4. Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). 5.  
Magnetita. 6. Liberação controlada - Fármacos. 7.  
Curcumina. 8. Células Caco-2. I. Muniz, Edvani  
Curti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.  
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação  
em Química. III. Título.

Cdd 21.ed.541.3

ECSL-001584



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Elizangela Aparecida Messias Soares de Almeida**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 23 de agosto de 2013.

**COMISSÃO JULGADORA:**



Prof. Dr. Edvani Curti Muniz  
Presidente - DQI/UEM



Prof. Dr. Eduardo Radovanovic  
Membro - DQI/UEM



Profa. Dra. Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia  
Membro - UNICAMP

***Meus sinceros agradecimentos,***

*A Deus pela vida e saúde, pela sabedoria, paciência e determinação.*

*Aos meus pais, Nelson e Aparecida, que com amor, carinho e dedicação sempre me apoiaram, me amaram e se orgulharam dos meus esforços.*

*Ao meu irmão Vinicius pelo amor e orgulho dedicado a mim, que muitas vezes me fizeram continuar.*

*Ao meu namorado Celso e sua família, pelo carinho, cumplicidade e compreensão dedicados a mim.*

*Ao professor Dr. Edvani C. Muniz pela oportunidade, orientação, apoio, amizade, prestatividade e compreensão.*

*Aos demais professores da Universidade Estadual de Maringá que contribuíram para o meu aprendizado e desenvolvimento profissional.*

*Aos amigos do Lab. 18 - Sala 04: Juliana, Cátia, Alessandro, André, Heveline, Marília, Guilherme, Leticia B., Leticia C, Bárbara, Valesca, Maroanne, que sempre me apoiaram, ajudaram e compartilharam momentos e experiências imprescindíveis.*

*Aos amigos Thais Moia e Adriano Valim Reis, que fazem parte desta conquista desde a iniciação científica.*

*À minha prima Analice por me apoiar, me ouvir e me aconselhar.*

*Às minhas amigas Layara e Amanda por me incentivar, me ouvir e pela grande amizade.*

*Ao COMCAP e toda a equipe de funcionários (Fábio, Cíntia, Valmir Calsavara), pela prestatividade, auxílio e compreensão.*

*Aos Professores Laudemir (IQSC-USP), Daniel (Instituto de Física -USP), Ivair Aparecido dos Santos (DFI-UEM) e Venícios Gonçalves Sombra (UFC) pelas análises de magnetização e GPC.*

*A Ivânia Schuquel pela sua amizade e presteza, me ajudando sempre com as análises de RMN <sup>1</sup>H.*

*Ao aluno de pós doutorado Ismael Casagrande Bellettini (UFSC) por realizar as medidas de potencial zeta, pela prestatividade e compreensão.*

*Aos amigos do GMPC e a secretaria da Pós-Graduação (Claudemir e Cristina).*

*A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.*

*A todos que contribuíram de forma direta e/ou indireta para a concretização deste trabalho e por isso são dignos de agradecimento.*

*Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças.  
Voam alto como águias; correm e não se cansam, caminham e  
não perdem as forças.*

*Isaiás 40:31*

*Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa  
inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande  
motivo para ser feliz!*

*Mario Quintana*

*O amor nunca faz reclamações; dá sempre. O amor tolera;  
jamaís se irrita e nunca exerce vingança.*

*Mahtma Gandhí*

*Nossos sonhos realizam-se á medida que avançamos num  
veículo feito de persistência, com motor movido á coragem e  
com a força de vontade rodando no lugar dos pneus.*

*Michele Bertolletti*

*A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso  
carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração  
espíritual que vem quando você descobre que alguém acredita  
e confia em você.*

*Ralph Waldo Emerson*

*Há sem dúvida quem ame o infinito,  
Há sem dúvida quem deseje o impossível,  
Há sem dúvida quem não queira nada  
Três tipos de idealistas, e eu nenhum deles:  
Porque eu amo infinitamente o finito,  
Porque eu desejo impossivelmente o possível,  
Porque eu quero tudo, ou um pouco mais, se puder ser,  
Ou até se não puder ser...*

*Álvaro Campos*

### *Publicações*

Alessandro F. Martins, Pedro V.A. Bueno, Elizângela A.M.S. Almeida, Francisco H.A. Rodrigues, Adley F. Rubira, Edvani C. Muniz. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 57 , p. 174-184, 2013.

Reis, Adriano V. ; Tambourgi, Elias B. ; Rubira, Adley F. ; S De Almeida, Elizângela A. M. ; Kunita, Marcos H. ; Guilherme, Marcos R. ; Muniz, Edvani C. . Copolymer hydrogel microspheres consisting of modified sulfate chondroitin-copoly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 121, p. 2726-2733, 2011.

Paulino, Alexandre T. ; Guilherme, Marcos R. ; Almeida, E. A. M. S. ; Pereira, Antonio G.B. ; Muniz, Edvani C. ; Tambourgi, Elias B. . One-pot synthesis of a chitosan-based hydrogel as a potential device for magnetic biomaterial. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 321, p. 2636-2642, 2009.

## RESUMO

Pesquisas voltadas ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos têm mostrado o grande potencial de dispositivos à base de polissacarídeos para este fim, pois estes materiais são, frequentemente, de baixo custo, atóxicos, biodegradáveis e de fontes renováveis. Este trabalho teve como objetivo principal obter hidrogéis baseados em matrizes de pectina para serem usados como dispositivos para liberação controlada de fármacos. Desta forma, a pectina (Pec) foi, primeiramente, modificada pela reação com o anidrido maleico (AM) visando a inserção de grupamentos vinílicos, imprescindíveis à formação de hidrogéis. A reação foi devidamente caracterizada pelas análises espectroscópicas de FTIR e RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS). Em seguida, a partir da pectina modificada (PecAM) foram obtidos géis microparticulados com geometria esférica (microesferas,  $\mu\text{P}$ ), com tamanho entre 20-36  $\mu\text{m}$ , em reação induzida por ultrassom, utilizando método de emulsão inversa e o PVA como estabilizante. A formação das matrizes reticuladas foi confirmada por análise de RMN  $^1\text{H}$ , na qual foi possível observar o desaparecimento dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio vinílicos e o aparecimento de sinais referentes aos átomos de hidrogênio das ligações CH e CH<sub>2</sub>. A formação de microesferas foi confirmada por imagens de MEV. Foram obtidas microesferas de PecAM-co-PNIPAm/Magnetita ( $\mu\text{PPM}$ ), com tamanho entre 0,5-26  $\mu\text{m}$ . A presença de magnetita foi confirmada por DRX, EDX e FTIR e quantificada por absorção atômica. A sensibilidade ao campo magnético foi analisada pelo uso de um magnetômetro de amostra vibrante (MAV). A presença de PNIPAm foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$ , por meio do aparecimento de sinais referentes aos grupos metileno e metil terminais. A medida da sensibilidade térmica (LCST) das microesferas foi avaliada por medidas de luz transmitida e de potencial zeta. Dependendo da formulação utilizada a LCST situa-se entre 31° e 43° C. Ensaio de liberação controlada de Curcumina (CUR) foram realizados em fluidos de simulação gástrica (SGF) e de simulação intestinal (SIF) empregando as microesferas do tipo  $\mu\text{P}$ -1 e  $\mu\text{PPM}$ -4, como dispositivos. Os resultados obtidos revelaram potencial para o uso destes sistemas como dispositivos para liberação de fármacos na região do intestino. Os estudos de cinética de liberação revelaram que a partição do fármaco entre a matriz e o meio externo, em conjunto com os fenômenos de difusão e relaxamento macromolecular, como os sugeridos por Reis et. al e por Ritger-Pepas, respectivamente, são os mecanismos associados à liberação de CUR a partir das microesferas obtidas nesta dissertação. Além disso, as amostras, principalmente a PecAM, apresentaram efeito inibitório no crescimento de células Caco-2. Os resultados obtidos indicam que este material possui características e propriedades desejáveis para aplicação no tratamento anticâncer.

**Palavras-chave:** Microesferas; pectina; anidrido maleico, PNIPAAm, magnetita, sistemas de liberação controlada de fármacos; Curcumina, células Caco-2.



## ABSTRACT

Researches dedicated to the development of systems for controlled drug release have focused in devices based on polysaccharides because, usually, such polymers are of low cost, nontoxic, biodegradable and from renewed resources. Therefore, the main target of this work was to obtain hydrogels based on Pectin to be used as devices for controlled drug release. For this, the Pectin (Pec) was chemically modified by reacting with maleic anhydride (MA), aiming to insert vinyl groups on Pec that are essential to the formation of Pec-based hydrogels. The reaction was adequately characterized by FTIR and NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS) spectroscopies. Based on modified pectin (PecMA) microspheres-typed hydrogels were obtained with size between 20-36  $\mu\text{m}$  using a reaction induced by ultrasound and a specific emulsion method and using PVA as stabilizer. The formation of crosslinked matrix was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR analysis, in which was possible to observe the disappearance of the signals related to the vinylic hydrogen atoms and the appearance of signs related to the hydrogen atoms due to CH and  $\text{CH}_2$  bonds. The spheric geometry and micro dimension (microspheres,  $\mu\text{P}$ ) were observed by SEM images. PecAM-co-PNIPAm/Magnetite ( $\mu\text{PPM}$ ) microspheres were obtained, sized from 0.5 to 26  $\mu\text{m}$ . The presence of Magnetite was confirmed by XRD, EDX and FTIR. The quantification was performed by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and the sensibility to the magnetic field was measured by use of a vibrating sample magnetometer (VSM). The presence of PNIPAm was confirmed by NMR  $^1\text{H}$  through of the appearance of signals related to the methylene and methyl terminals groups. The thermal sensitivity (LCST) of microspheres was evaluated by measures of transmitted light intensity and Zeta potential. Depending on the used formulation, the LCST fall between 31 to 43  $^\circ\text{C}$ . Tests of controlled release of Curcumin (CUR) were performed in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) employing, as devices, microspheres type  $\mu\text{P}$ -1 and  $\mu\text{PPM}$ -4. The results revealed the potential for the use of these systems as devices for drug delivery in intestine environments. Kinetic studies carried out revealed that the mechanisms of release from the microspheres are the matrix-solute-external fluid partition together the diffusion and macromolecular relaxation phenomena as suggested by Reis et. al. and Ritger-Pepas, respectively. Furthermore, the samples, especially the PecAM, showed an inhibitory effect on the growth of Caco-2 cells. The results indicate that these materials possess desirable properties and characteristics for use in anticancer treatment.

Keywords: microspheres; pectin; maleic anhydride, PNIPAAm, magnetite, systems controlled drug release; Curcumin, Caco-2 cells.

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Esquema do aparato utilizado para a medida da luz transmitida através das partículas do hidrogel em função da temperatura. ....	25
<b>Figura 2.1.</b> Unidade repetitiva da cadeia de uma pectina (Pec). ....	28
<b>Figura 2.2.</b> Anidrido Maleico (AM) e reações de hidratação e hidrólise. ....	31
<b>Figura 2.3.</b> Esquema da reação de modificação da pectina (Pec) com anidrido maleico (AM). ....	35
<b>Figura 2.4.</b> Espectros FTIR: do AM, da Pec, e do produto da modificação (PecAM). ....	36
<b>Figura 2.5.</b> Espectro FTIR: da Pec e da PecAM, região de 1800-1600 cm <sup>-1</sup> . O deslocamento da banda de carbonila indica a presença de sistema éster conjugado na PecAM. ....	37
<b>Figura 2.6.</b> Espectros FTIR: a) área relativa a COOH e COO <sup>-</sup> da Pec, b) área relativa a COOH e COO <sup>-</sup> da PecAM, c) área relativa COOH, deformação fora do plano da Pec e PecAM ....	38
<b>Figura 2.7.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da PecAM, Pec e AM, obtidos em D <sub>2</sub> O, 300 MHz. ....	39
<b>Figura 2.8.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C-CP/MAS no estado sólido da Pec, PecAM e AM. ....	41
<b>Figura 2.9.</b> Perfil de eluição de Pec e PecAM, obtidos por GPC. ....	42
<b>Figura 2.10.</b> Curvas de TG e a primeira derivada (DTG) ( <i>inset</i> ) para a Pec e PecAM. ....	43
<b>Figura 2.11.</b> Difrátogramas de DRX da Pec, da PecAM e do AM. ....	45
<b>Figura 2.12.</b> Imagens obtidas por MEV: (a) da Pec e (b) da PecAM. ....	46
<b>Figura 3. 1.</b> Perfil de liberação estabelecido por sistemas de administração convencional vs sistemas de liberação controlada. ....	48
<b>Figura 3. 2.</b> Localização de tecidos aplicáveis em sistemas de liberação de fármacos baseados em hidrogel. ( <i>Peppas, Bures et al. 2000</i> ). ....	53
<b>Figura 3. 3.</b> Imagens obtidas por MEV de: (a) μP0, Sem PVA; (b) μP1, PVA22 3,0%; (c) μP2, PVA10 3,0%; (d) μP3, PVA22 30,0%. ....	59
<b>Figura 3. 4.</b> Tamanho médio e distribuição de tamanho das microesferas. (a) μP0; Sem PVA, (b) μP1, PVA22 3,0%, (c) μP2, PVA10 3,0%, (d) μP3, PVA22 30,0%. ....	61
<b>Figura 3. 5.</b> Imagens obtidas por MEV de: (a) μP4, tempo = 35 min; (b) μP5, AB:H <sub>2</sub> O = 4:1; (c) μP6, Amplitude = 80,0 %. ....	62
<b>Figura 3. 6.</b> a) Curvas de TG e b) a primeira derivada (DTG), para as microesferas μP0, μP1, μP2, μP3 e PecAM. ....	64
<b>Figura 3. 7.</b> Difrátogramas μP0, μP1, μP2, μP3 e PecAM. ....	66
<b>Figura 3. 8.</b> Espectros de RMN <sup>1</sup> H da PecAM e de micropartículas μP1. ....	67
<b>Figura 4. 1.</b> Estrutura química de monômeros N-isopropil acrilamida (NIPAAm) e da poli (N-isopropil acrilamida) (PNIPAAm). ....	71
<b>Figura 4. 1.</b> a) Mudança de comportamento (hidrofílica/hidrofóbico) do PNIPAAm frente à água, LCST; b) Diagrama de Fases LCST e UCST, destacando o comportamento LCST do PNIPAAm. ....	72
<b>Figura 4. 3.</b> Imagens obtidas por MEV de: (a) μPPM-1; (b) μPPM-2; (c) μPPM-3; (d) μPPM-4; ....	80
<b>Figura 4. 4.</b> Imagens de MEV, a) μPP-1, b) μPP-1b, c) μPP-1c, d) μPM-1, e) μPM-1b, f) μPPM-6c. ....	82
<b>Figura 4. 5.</b> Difrátogramas da magnetita, das partículas μPPM-1, μPPM-4, μPPM-3, ....	82
<b>Figura 4. 6.</b> Espectros de EDX das micropartículas tipo μPPM (que contém PecAM, PNIPAAm e magnetita) obtidas em emulsão água/álcool benzílico. ....	83
<b>Figura 4. 7.</b> Espectros FTIR das microesferas μPPM-1, da μPPM-3, da μPPM-4, da μPPM-5, da μPPM-6, da μPPM-6b. ....	84

<b>Figura 4. 8.</b> Espectros de RMN <sup>1</sup> H da PNIPAAm, PecAM, μP1 e μPP-1b. ....	85
<b>Figura 4. 9.</b> (a) Curvas de TG e (b) Curvas de DTG, amostras PecAM, μP1, μPP-1-b, μPPM-3, μPPM-4, μPPM-5. ....	87
<b>Figura 4. 10.</b> Ciclos de histerese das microesferas μPPM-3, μPPM-4, μPPM-5 e magnetita (inset).....	88
<b>Figura 4. 11.</b> Intensidade relativa de luz transmitida através das soluções contendo as microesferas μPPM-3, μPPM-4 ou μPPM-5.....	90
<b>Figura 4. 12.</b> Variação do diâmetro das microesferas com o aumento de temperatura. ....	91
<b>Figura 4. 13.</b> Potencial Zeta em função da temperatura. ....	93
<b>Figura 5. 1.</b> Estrutura química da CUR. ....	97
<b>Figura 5. 2.</b> Perfis de liberação de CUR a partir de microesferas μP-1 em SIF e SGF a 25° C e 37° C.....	105
<b>Figura 5. 3.</b> Perfis de liberação de CUR a partir das microesferas μPPM-4 em SIF e SGF a 25° C, na presença e ausência do campo magnético (CM) .....	106
<b>Figura 5. 4.</b> Perfis de liberação de CUR a partir das microesferas μPPM-4 em SIF e SGF a 37° C, na presença e ausência do campo magnético (CM). ....	107
<b>Figura 5. 5.</b> Valores de fração liberada (F <sub>L</sub> ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2., para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da μP-1, a 25° C, em SIF.....	110
<b>Figura 5. 6.</b> Valores de fração liberada (F <sub>L</sub> ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2, para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da μP-1, a 37° C, em SIF.....	110
<b>Figura 5. 7.</b> Valores de fração liberada (F <sub>L</sub> ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2, para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da μPPM-4, a 25° C, em SIF. ....	111
<b>Figura 5. 8.</b> Valores de fração liberada (F <sub>L</sub> ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2, para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da μPPM-4, a 25° C, em SIF, na presença de campo magnético (CM).....	111
<b>Figura 5. 9.</b> Valores de fração liberada (F <sub>L</sub> ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2., para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 4.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da μPPM-4, a 37° C, em SIF. ....	112
<b>Figura 5. 10.</b> F <sub>L</sub> Valores de fração liberada (F <sub>L</sub> ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2., para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da μPPM-4, a 37° C, em SIF, na presença de campo magnético (CM). ....	112
<b>Figura 5. 11.</b> Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos citotóxicos das amostras Pec, PecAM, μP1, μPPM-3 μPPM-4 e μPPM-5 frente o crescimento de células tumorais Caco-2.....	114

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2. 1.</b> Valor do grau de substituição da PecAM. ....	41
<b>Tabela 2. 2.</b> Valores das distâncias periódicas (d) na estrutura da Pec, da PecAM e do AM obtidas por DRX após aplicação da Equação (2.1). ....	45
<b>Tabela 2. 3.</b> Valores de diâmetro hidrodinâmico médio e de PecAM, em solução. Os valores foram obtidos por meio do equipamento Zetasizer Nano ZS com laser de He-Ne ( $\lambda = 633$ nm) em um ângulo fixo de $173^\circ$ . ....	46
<b>Tabela 3. 1.</b> Condições utilizadas para o estudo da influência do PVA e de sua massa molar na obtenção de microesferas de PecAM. ....	56
<b>Tabela 3. 2.</b> Condições utilizadas para o estudo da influência do tempo de reação, da proporção AB:H <sub>2</sub> O e da amplitude das ondas de ultrassom na preparação de micropartículas de PecAM. ....	57
<b>Tabela 4. 1.</b> Condições empregadas nas sínteses das microesferas $\mu$ PPM. ....	77
<b>Tabela 4. 2.</b> Condições empregadas para os experimentos complementares descritos na seção 4.3.2.2. ....	78
<b>Tabela 4. 3.</b> Tamanho médio e intervalo de distribuição de tamanho das microesferas de PecAM-PNIPAAm-Magnetita ( $\mu$ PPM). Tamanhos obtidos por meio das imagens de MEV (Fig 4.3). ....	81
<b>Tabela 5. 1.</b> Condições estabelecidas para o estudo de liberação “ <i>in vitro</i> ” de Curcumina, a partir das microesferas $\mu$ P-1 e $\mu$ PPM-4. ....	100
<b>Tabela 5. 2.</b> Parâmetros obtidos pela aplicação dos modelos propostos por Ritger e Pepas (Eq. 5.1) e por Reis et. al (Eq. 5.2 a 5.4) aos perfis de liberação de CUR. ....	109

## Índice de Equações

<b>Equação 2.1.</b> Lei de Bragg .....	44
<b>Equação 5.1.</b> Determinação da cinética de liberação, Modelo de Ritger e Pepas .....	101
<b>Equação 5.2.</b> Determinação da cinética de liberação de primeira ordem reversível, Modelo de Reis et. al. ....	101
<b>Equação 5.3.</b> Determinação da cinética de liberação de segunda ordem reversível, Modelo de Reis et.al... ..	102
<b>Equação 5.4.1</b> Determinação da constante de velocidade de liberação $k_L$ , para mecanismos de liberação de primeira ordem reversível, Modelo de Reis et. al. ....	102
<b>Equação 5.4.2.</b> Equação 5.4. 2. Determinação da constante de velocidade de liberação $k_L$ , para mecanismos de liberação de de segunda ordem reversível, Modelo de Reis et. al. ....	102
<b>Equação 5.5.</b> Percentagem de toxicidade celular .....	103

### *Lista de Abreviações*

<b>μP</b>	Micropartículas de PecAM
<b>μPP</b>	Micropartículas de PecAM-co-PNIPAAm
<b>μPPM</b>	Micropartículas de PecAM-co-PNIPAAm –Magnetita
<b>AB</b>	Álcool benzílico
<b>ACS</b>	American Chemical Society
<b>AGal</b>	Ácido galacturônico não esterificado
<b>AGalMe</b>	Ácido galacturônico esterificado
<b>AM</b>	Anidrido maleico
<b>aq.</b>	Aquoso
<b>C6</b>	Carbono, posição 6
<b>CM</b>	Campo magnético
<b>CUR</b>	Curcumina
<b>DMF</b>	N,N dimetilformamida
<b>Fe3O4</b>	Magnetita
<b>F<sub>L</sub></b>	Fração de fármaco ou soluto liberado pelo hidrogel em um tempo específico
<b>F<sub>max</sub></b>	Fração de soluto liberada quando o sistema atinge o estágio de equilíbrio de liberação
<b>GM</b>	Grau de metoxilação da Pec
<b>GS</b>	Grau de substituição
<b>HT</b>	Hipertermia
<b>K</b>	Constante de velocidade, Modelo Ritger e Pepas.
<b>k<sub>L</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>	Constante de velocidades de liberação (s <sup>-1</sup> ) Reis et. Al.
<b>LCST</b>	Temperatura Crítica Inferior de Solubilização
<b>MNPs</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>N<sub>2(g)</sub></b>	Gás Nitrogênio
<b>NIPAAm</b>	N-isopropil acrilamida
<b>P.A.</b>	Reagente apropriado para análise
<b>Pec</b>	Pectina
<b>PecAM</b>	Pectina Modificada com anidrido maleico
<b>PNIPAAm</b>	Poli(N-isopropilacrilamida)
<b>PS</b>	Persulfato de sódio
<b>PVA</b>	Poli (álcool vinílico)
<b>PVA10</b>	PVA de MM média 9000-10000 g/mol
<b>PVA22</b>	PVA de MM média 22.000 g/mol
<b>PVAc</b>	Poli(acetato de vinila)
<b>SGF</b>	Fluido gástrico simulado
<b>SIF</b>	Fluido intestinal simulado
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<b>UCST</b>	Temperatura Crítica Superior de Solubilização
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia
<b>VE</b>	Volume de eluição
<b>α</b>	Atividade partição

### *Lista de Símbolos*

°C	Graus Centigrados
Cm	Centímetros
emu	Unidade eletromagnética
G	Gramas
H ou h	Horas
Hz	Hertz
kHz	Quilo-Hertz
Oe	Oersted unidade de Campo magnético numericamente equivalente a Gauss.
kV	Quilo-Volt
L	Litros
mA	Miliampere
Min	Minuto
Mm	Milímetro
m/v	Razão massa/volume
mV	Mili-Volt
m/m	Razão massa/massa
Mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
Ng	Nanograma
S	Segundos
v/v	Razão volume/volume

**ÍNDICE**

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>15</b>
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA DISSERTAÇÃO .....	21
1.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO .....	22
1.3.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR.....	22
1.3.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN <sup>1</sup> H .....	22
1.3.3. Ressonância magnética nuclear no estado sólido – CP/MAS RMN <sup>13</sup> C .....	23
1.3.4. Microscopia eletrônica de Varredura – MEV .....	23
1.3.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	23
1.3.6. Difratomia de Raios-X (DRX).....	24
1.3.7. Medidas de Potencial Zeta e de Tamanho de Partículas em Solução .....	24
1.3.8. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	25
1.3.9. Medidas de Intensidade de Luz Transmitida através das partículas .....	25
1.3.10. Medidas de Magnetização.....	26
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>27</b>
<b>MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA</b>	<b>27</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	27
2.2. OBJETIVOS .....	32
2.3. EXPERIMENTAL.....	32
2.3.1. Materiais .....	32
2.3.2. Procedimentos.....	33
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
2.5. CONCLUSÕES .....	47
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>48</b>
<b>PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PECTINA MODIFICADA</b>	<b>48</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	48
3.1.1. Sistemas de liberação de fármacos .....	48
3.1.2. Hidrogéis .....	51
3.2. OBJETIVOS .....	54
3.3. EXPERIMENTAL.....	55
3.3.1. Materiais .....	55
3.3.2. Procedimentos.....	55
3.3.2.1. <i>Preparação das micropartículas de PecAM</i> .....	55
3.3.2.2. <i>Avaliação da influência das condições utilizadas na formação de microesferas</i> .....	56
3.3.2.3. <i>Purificação das micropartículas</i> .....	57
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	57
3.4.1. <i>Influência da concentração e massa molar do PVA</i> .....	57
3.4.2. <i>Influência do tempo de reação, proporção AB:H<sub>2</sub>O e a amplitude das ondas de ultrassom.</i> .....	61
3.6. CONCLUSÕES .....	68
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>69</b>
<b>PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PecAM COM PROPRIEDADES TERMOSENSÍVEL E MAGNÉTICAS.</b>	<b>69</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	69
4.1.1. Hidrogéis inteligentes .....	69

4.1.1.1. Hidrogéis sensíveis à temperatura.....	69
4.1.1.2. Hidrogéis sensíveis ao campo magnético .....	72
4.2. OBJETIVOS .....	75
4.3. EXPERIMENTAL.....	75
4.3.1. Materiais .....	75
4.3.2. Procedimentos.....	76
4.3.2.1. Síntese da PNIPAAm.....	76
4.3.2.2. Microesferas de PecAM-co-PNIPAAm-Magnetita ( $\mu$ PPM).....	76
4.3.2.2. Experimentos complementares ao estudo da formação de microesferas de PecAM.....	77
4.3.2.3. Purificação das microesferas .....	78
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	79
4.4.1. Microesferas de PecAM-co-PNIPAAm-Magnetita ( $\mu$ PPM) .....	79
4.4.2. Análise dos experimentos complementares .....	81
4.4.3. Análise da sensibilidade das partículas $\mu$ PPM-3, $\mu$ PPM-4 e $\mu$ PPM-5 ao Campo Magnético .....	87
4.4.4. Sensibilidade à Temperatura.....	89
4.4.4.1. Medida da LCST por luz transmitida através das partículas .....	89
4.4.4.2. Medidas de diâmetro médio.....	90
4.4.4.3 Medidas de Potencial Zeta .....	92
4.5. CONCLUSÕES .....	93
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>95</b>
<b>ENSAIOS DE LIBERAÇÃO “in vitro” DE CURCUMINA</b>	<b>95</b>
5.1. INTRODUÇÃO .....	95
5.1.1. Curcumina.....	95
5.2. OBJETIVOS .....	98
5.3. EXPERIMENTAL.....	99
5.3.1 Materiais .....	99
5.3.2. Procedimentos.....	99
5.3.2.1. Carregamento de Curcumina (CUR) nas microesferas $\mu$ P-1 e $\mu$ PPM-4.....	99
5.3.2.2. Liberação “in vitro” de Curcumina .....	99
5.3.2.3. Cinética de Liberação .....	101
5.3.2.4. Avaliação da citotoxicidade sobre células Caco-2.....	102
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	104
5.4.1. Ensaio de Liberação de Curcumina .....	104
5.4.2. Cinética de Liberação .....	107
5.4.3. Efeito citotóxico sobre células tumorais Caco-2 .....	113
5.5. CONCLUSÕES .....	115
<b>CAPÍTULO VI</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>116</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>117</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>122</b>



## CAPÍTULO I

**1. INTRODUÇÃO GERAL**

O desenvolvimento de novos materiais utilizados como dispositivos de liberação controlada de moléculas farmacologicamente ativas têm mostrado ser de grande interesse (*Rubinstein, Radai et al. 1993*), (*Lorenzo-Lamosa, Remunan-Lopez et al. 1998*), (*Tammaro, Costantino et al. 2007*). Na maior parte das pesquisas, busca-se resolver problemas atualmente associados à administração convencional de fármacos. Entre os principais problemas, podem ser citados: a distribuição sistêmica geral, a inespecificidade para um local patológico, a necessidade de uma alta dose para atingir alta concentração local, a toxicidade e outros efeitos secundários adversos (*Mahmoudi, Sant et al. 2011*), (*Mandal, Biswas et al. 2010*). A exemplo disto, a quimioterapia convencional é incapaz de fornecer doses de medicamento suficientes para tratar apenas as áreas afetadas do corpo (*Working and Dayan 1996*). Além da toxicidade sistêmica, que limita o uso de fármacos necessários ao tratamento, a necessidade de uma alta dosagem de medicamento para que o tratamento seja eficaz é um problema adicional.

Na busca para solucionar tais limitações, os dispositivos construídos de materiais poliméricos são alternativas promissoras para o encapsulamento de fármacos quimioterápicos, uma vez que muitos materiais poliméricos apresentam frequentemente reduzida toxicidade. Por isso, funcionam como uma caixa de proteção para o fármaco, o que limita a sua interação com células saudáveis e proporciona, ainda, entre outros efeitos: i) taxa de liberação controlada a longo tempo; ii) bioatividade prolongada; e iii) redução de efeitos secundários.

Dispositivos poliméricos com tecnologias inteligentes, ou seja, que respondem a estímulos externos têm recebido destaque e podem ser divididos em duas classes. Na primeira, chamada de direcionamento local, as partículas ativas do fármaco ligam-se especificamente a células doentes por meio da utilização de moléculas como anticorpos, ligantes e aptâmeros. Na segunda classe, chamada

de desencadeamento local, qualquer alteração química ou física no ambiente, onde se encontra o dispositivo, desencadeia a liberação do fármaco (*Brewer, Coleman et al. 2011*).

Nesse sentido, os hidrogéis têm desempenhado um papel primordial para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (*Peppas, Bures et al. 2000*), (*Van Vlierberghe, Dubruel et al. 2011*). Os hidrogéis pertencem a uma classe extremamente importante de materiais com enorme potencial de aplicação em biotecnologia e ciências farmacêuticas. Podem ser concebidos para exibir variações significativas de volume em resposta a pequenas mudanças no ambiente ao qual está inserido, tais como pH, força iônica, temperatura, campo elétrico, solvente, campo magnético, etc. (*Sahiner, Godbey et al. 2006*). Além disso, o uso de polímeros naturais na preparação de hidrogéis apresenta vantagens adicionais tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade, conduzindo segurança ecológica e possibilidade de preparação de uma variedade de derivados, química e/ou enzimaticamente modificados, para usos específicos (*Racovita, Vasiliu et al. 2009*). Dentre as propriedades mais importantes presentes nos dispositivos de hidrogéis poliméricos para liberação controlada de fármacos estão as sensibilidades a variação de pH, da temperatura e de intensidade de campo magnético.

Hidrogéis poliméricos termicamente sensíveis podem apresentar dois diferentes comportamentos em função da temperatura: i) aqueles que, em resposta ao aumento de temperatura, colapsam, exemplo: poli(N-isopropil acrilamida), portanto diminuem seu volume; e ii) os que, em resposta ao aumento de temperatura, se expandem, exemplo: poli(ácido acrílico), exibindo um aumento no grau de intumescimento (*Owens, Jian et al. 2007*). Polímeros biocompatíveis e termosensíveis têm ganhado grande atenção na década atual. Vários polímeros como elastina, poli(álcool vinílico), poli(N-isopropil acrilamida), hidroxipropil celulose, etc., já foram amplamente investigados e suas potencialidades continuam sendo exploradas. Dos polímeros sensíveis à temperatura, o poli(N-isopropil acrilamida) (ou PNIPAAm) é o mais extensivamente estudado. Este

responde a mudanças de temperatura, tendo sua temperatura de transição hidrofílico-hidrofóbico entre 32-33 °C. Esta temperatura é conhecida como LCST (*Lower Critical Solution Temperature*) (Jaiswal, Banerjee et al. 2010), (Oh, Drumright et al. 2008). A estrutura química e física de um polímero à base de PNIPAAm pode ser projetada, por uso de metodologia específica, para que sua LCST possa ocorrer próximo da temperatura do corpo humano (Jaiswal, Banerjee et al. 2010), (de Moura, Aouada et al. 2006). Abaixo da LCST, a estrutura do PNIPAAm permanece hidratada e acima da LCST ela adquire uma forma mais compacta, perdendo grande quantidade da água de intumescimento.

Os materiais sensíveis ao pH e à temperatura que atuam em funcionalidades específicas apresentam, frequentemente, sérias limitações nos tratamentos *in vivo*, principalmente nos pacientes que sofrem de doenças com episódios febris ou doenças que afetam o sistema gástrico. Estes podem apresentar significativa variação da temperatura corpórea ou do pH fisiológico e, assim, a liberação do fármaco poderá estar comprometida. Desta forma, materiais que respondem a estímulos magnéticos podem apresentar-se como alternativas para solucionar estes problemas (Mauricio, Guilherme et al. 2012).

Desde os meados dos anos 1970, as partículas magnéticas micro/nanométricas têm sido amplamente utilizadas nos campos biomédicos. A alta relação superfície/volume das nanopartículas magnéticas (MNPs) fornece inúmeros sítios quimicamente ativos para a conjugação de biomoléculas, permitindo um delicado *design* e engenharia destas para o desempenho das funções pretendidas, tal como a circulação na corrente sanguínea por longo tempo, alvo especificidade para o tecido lesionado, detecção óptica ou por imagens utilizando propriedades espectroscópicas ou magnéticas, liberação de medicamentos e ressonância magnética (Purushotham and Ramanujan 2010).

Dispositivos consistindo exclusivamente de materiais magnéticos tais como a magnetita, maghemita, ferrita de cobalto, dióxido de cromo, ferro, níquel carbonilo, cobalto, neodímio-ferro-boro ou de samário-cobalto para liberação de fármacos podem ser desenvolvidos. No entanto, as principais limitações destes materiais são a sua baixa capacidade de carregamento de fármacos e o difícil controle de liberação (*Arias, Ruiz et al. 2008*). Dentre os materiais magnéticos de maior interesse estão as nanopartículas que apresentam comportamento superparamagnético, como a magnetita e a maghemita que são as mais empregadas em aplicações biomédicas, uma vez que a sua biocompatibilidade já foi comprovada (*Mahmoudi, Sant et al. 2011*).

Superparamagnetismo ocorre em partículas cujo tamanho é bem reduzido, estando abaixo de cerca de 15 nm (*Battle and Labarta 2002*). A excitação térmica induz flutuações do momento magnético dessas partículas com relação ao tempo de observação (*Kodama 1999*). Devido ao seu tamanho, as nanopartículas superparamagnéticas individuais necessitam da aplicação de um forte campo magnético para que sejam eficientemente manipuladas pelo campo. No entanto, as partículas maiores ferri/ferromagnéticas podem ser facilmente manipuladas por um campo magnético mais baixo, mas frequentemente aglomeram-se devido às atrações magnéticas (*Gyergyek, Makovec et al. 2010*). Em contraste, quando as nanopartículas superparamagnéticas são dispersas em uma matriz polimérica, formando nanocompósitos, toda a natureza superparamagnética das nanopartículas é mantida no nanocompósito, o qual se torna suficientemente grande, portanto com tamanho desejado para ser efetivamente manipulado por um campo magnético. Ao mesmo tempo, exibe alta magnetização e os problemas de aglomeração são reduzidos.

Por sua vez, as partículas magnéticas de magnetita e maghemita encapsuladas em polímeros funcionais têm recebido enorme atenção devido às suas potenciais aplicações em diferentes áreas tais como a liberação direcionada de fármacos, purificação de proteínas, detecção, separação, marcação celular, biossensores, imobilização de enzimas, entre outras (*Arruebo, Fernandez-*

*Pacheco et al. 2007*), (*Satarkar, Biswal et al. 2010*), (*Ma, Guan et al. 2006*), (*Dressman, Yan et al. 2003*), (*Girginova, Daniel-Da-Silva et al. 2010*). O encapsulamento de partículas de óxido de ferro magnético em matrizes poliméricas proporciona qualidades que não podem ser encontradas em partículas magnéticas não revestidas. Por exemplo, nas partículas magnéticas revestidas com polímero contendo grupos funcionais ionizáveis formando microesferas magnéticas de poli(metacrilato de glicidila) (PGMA), estabilizadas por carboximetil dextrana, o grupo  $\text{COO}^-$  possui afinidade com íons  $\text{Fe}^{3+}$  enquanto a parte de dextrana permite a dispersão em água e previne a agregação das partículas (*Pollert, Knizek et al. 2006*). Além disso, o revestimento da superfície de partículas magnéticas por polímeros funcionais fornece um material com propriedades biocompatíveis ótimas, protege as partículas de susceptibilidade de lixiviação e oxidação (*Rahman, Chehimi et al. 2011*).

Nanocompósitos magnéticos são, geralmente, produtos da união de materiais inorgânicos, tal como os materiais magnéticos, e orgânicos, tal como os hidrogéis. Estes têm sido amplamente utilizados em diversas aplicações devido à sua comprovada biocompatibilidade e resposta rápida a diferentes alterações externas. Partículas baseadas em polissacarídeos e magnetita nas escalas micro/nanométrica surgiram como uma estratégia inovadora para novas formulações cujas propriedades podem ser ajustadas para utilização em diferentes áreas.

Polissacarídeos são polímeros naturais e constituem a classe de polímeros mais abundante na biosfera. São extremamente bioativos e biocompatíveis (*Van Vlierberghe, Dubruel et al. 2011*). Há grande variedade de tipos de polissacarídeos. Muitos são derivados de matérias-primas agrícolas, de resíduos da casca de crustáceos ou ainda sintetizados por micro-organismos (*Van Vlierberghe, Dubruel et al. 2011*), (*Racovita, Vasiliu et al. 2009*). Os polissacarídeos são polímeros constituídos por unidades repetitivas monossacarídicas e podem ser de diferentes origens, vegetal (por exemplo: pectina, goma de guar), microbiana (por exemplo: dextrana, goma de xantana), animal (por

exemplo: quitosana, sulfato de condroitina) e oriundos de algas (por exemplo: alginato). A diversidade na composição química dos polissacarídeos contribui para uma enorme variedade de estruturas e propriedades, devido à presença de um grande número de grupos reativos e ampla faixa de peso molecular. Os polissacarídeos positivamente carregados (por exemplo: quitosana, N,N,N-trimetil quitosana, etc.) ou negativamente carregados (por exemplo: alginato, heparina, ácido hialurônico, pectina, etc.) são denominados como polietrólitos. Mas há, ainda, os polissacarídeos que não apresentam grupos ionizáveis em sua estrutura e por isso não são facilmente carregáveis eletricamente (não-polietrólitos) (*Sinha and Kumria 2001*).

A presença de uma grande variedade de grupos químicos ligados à cadeia polimérica de um polissacarídeo permite que este seja química/biologicamente modificado, dando origem a uma enorme variedade de derivados. Além disso, os grupos hidrofílicos, tais como hidroxila, grupos carboxila e amino, presentes na maioria das estruturas de polissacarídeos podem se ligar a tecidos biológicos, principalmente epitélios e mucosas, por ligações não covalentes, funcionando como materiais bioadesivos (*Liu, Jiao et al. 2008*).

A pectina é um polissacarídeo natural, não-tóxico, extraído da casca de frutas cítricas ou do bagaço da maçã. É constituída essencialmente por resíduos de ácido  $\alpha$  (1-4) D-galacturônico linearmente ligados (*Racovita, Vasiliu et al. 2009*). No entanto, a pectina, tal como os demais polissacarídeos, não tem boa capacidade para formar partículas esféricas devido à complexidade dos fragmentos macromoleculares e às suas características estruturais e conformacionais, dificuldades estas que se tornam ainda mais relevantes nas escalas micro e nanométrica (*Mauricio, Guilherme et al. 2012*). A formação de arquitetura específica depende das forças de atração que se estabelecem entre os compostos em um meio com hidrofílicidade/hidrofobicidade apropriada (*Rahman, Chehimi et al. 2011*), (*Ebewele 1996*).

### **1.1. OBJETIVO GERAL DA DISSERTAÇÃO**

Na presente dissertação, buscou-se unir as propriedades:

- i) termo responsivas do PNIPAAm;
- ii) magnéticas das nanopartículas de magnetita;
- iii) biocompatibilidade da pectina,

visando obter micro/nanogéis magnéticos e termossensíveis. A hipótese investigada é que materiais baseados em pectina, PNIPAAm e possuindo magnetita, preparados por meio de metodologias específicas a serem descritas nos próximos capítulos desta Dissertação, apresentem valor de LCST acima de 42 °C e sensibilidade magnética para aplicações no tratamento de câncer por hipertermia. Neste sentido, estes materiais seriam alternativas interessantes para o tratamento por hipertermia combinado ao sistema de liberação de fármacos, no qual algum princípio ativo carregado previamente ao material poderia ser liberado quando acima da LCST, devido à hipertermia magnética. Assim, tais materiais podem ser eficazes para a terapia do câncer utilizando a combinação da hipertermia e da quimioterapia (*Jaiswal, Banerjee et al. 2010*).

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA DISSERTAÇÃO**

Para investigar a hipótese acima descrita, foram necessárias várias etapas experimentais, buscando atingir os seguintes objetivos específicos:

- Inserção de grupamentos vinílicos na estrutura da pectina, por meio de reação química com anidrido maleico, para posterior reação de polimerização/reticulação;
- Obtenção de micro/nanopartículas por polimerização em emulsão, água em álcool benzílico, induzida por sonicação;
- Caracterização dos materiais de partida e das micropartículas com foco nas propriedades espectroscópicas: FTIR e RMN; propriedades térmicas: TGA/DTG; propriedades de superfície:

potencial zeta; propriedades estruturais: DRX e MEV (morfologia) e análise química: EDX, FAAS;

- Avaliação da LCST dos materiais obtidos por meio de medidas de luz transmitida.
- Avaliação das melhores condições para obtenção de micro/nanopartículas;
- Avaliação da liberação de Curcumina a partir das micropartículas carregadas com este fármaco.
- Análises de citotoxicidade frente células tumorais do tipo Caco-2.

### **1.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO**

#### **1.3.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR**

Todos os espectros FTIR foram obtidos em espectrômetro Bomem FTIR modelo MB-100, na faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras, em pó, foram misturadas com KBr a 1% m/m e prensadas na forma de pastilhas. Os espectros foram adquiridos no modo de transmitância com resolução típica de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Para isso, foram acumuladas 64 varreduras para obter cada espectro.

#### **1.3.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN $^1\text{H}$**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus 300, operando a 300 MHz com tempo de relaxação e frequência de pulsos iguais a 30 s e 90°, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos a partir de soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  na concentração de 5  $\text{mg mL}^{-1}$ , contendo 0,05% de tetrametilsilano (TMS) como referência.



### 1.3.3. Ressonância magnética nuclear no estado sólido – CP/MAS RMN $^{13}\text{C}$

Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido foram obtidos em espectrômetro de RMN Varian, modelo Mercury Plus 300, que opera na frequência de 75,457 MHz para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ , equipado com sonda de sólidos CP/MAS de 7 mm. Utilizou-se a técnica CP-MAS, sendo os principais parâmetros de aquisição: tempo de contato de 3 ms e tempo de espera para reciclagem (d1) de 3 s. Os deslocamentos químicos foram obtidos usando como referência externa da ressonância do carbono metílico, em 17,3 ppm, o padrão hexametilbenzeno (HMB).

### 1.3.4. Microscopia eletrônica de Varredura – MEV

As análises morfológicas das amostras foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu, modelo SS550 Superscan, acoplado a um sistema de análise por energia dispersiva de raios-X (EDX). Antes de proceder as análises de MEV as amostras secas (pó) foram colocadas sobre fitas de carbono, aderidas ao porta-amostra e recobertas com uma fina película de ouro. Aplicou-se uma tensão de 15 kV e intensidade de corrente de 30 mA. A análise química foi obtida pela técnica espectroscópica de energia dispersiva de raios-X (EDX), que possibilita a determinação da composição química qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios-X característicos.

### 1.3.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas de TG foram obtidas em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TG-50, operando com taxa de aquecimento  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , em atmosfera de  $\text{N}_2$  com fluxo de  $50\text{ mL min}^{-1}$ , na faixa de temperatura entre 25 a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As Curvas de DTG foram obtidas, para cada material, aplicando-se a derivada primeira aos dados da respectiva curva de TG.

### 1.3.6. Difractometria de Raios-X (DRX)

As amostras secas, em forma de pó, foram analisadas em um difratômetro de raios-X, modelo D8 Advance, da marca Bruker, em uma faixa de varredura ( $2\theta$ ) de 5 a 70°, com resolução de 0,02°, em uma velocidade de varredura de 0,6° min<sup>-1</sup>. A radiação foi gerada em linha de CuK $\alpha$  a 40,0 kV e 30,0 mA ( $\lambda = 0,15418$  nm).

### 1.3.7. Medidas de Potencial Zeta e de Tamanho de Partículas em Solução

Considerando as partículas como sendo esféricas, o seu diâmetro médio ( $D_h$ ) foi determinado usando um Zetasizer Nano ZS com laser de He-Ne ( $\lambda = 633$  nm) em um ângulo fixo de 173°. As medidas de potencial zeta foram realizadas no mesmo equipamento, utilizando uma cela capilar com eletrodos. Todas as medidas foram realizadas a partir de uma solução tampão fosfato, pH 7, contendo 1,0 mg mL<sup>-1</sup> das amostras.

Para as medidas do diâmetro e potencial zeta, nas temperaturas estabelecidas, aguardou-se o tempo de 2 min (suficiente para atingir o equilíbrio térmico) e as medidas foram realizadas em triplicatas.

No caso de Pec e PecAM, em que as medidas foram realizadas no material não reticulado, portanto solúvel, foi medido o diâmetro hidrodinâmico das cadeias dos polímeros utilizando a mesma metodologia acima descrita.

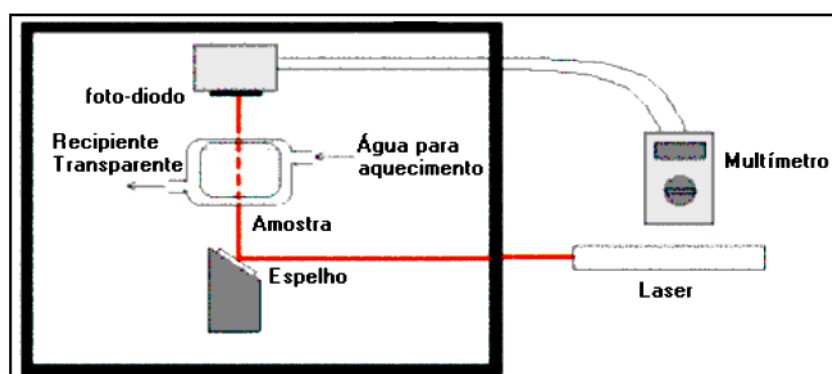
### 1.3.8. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10AD acoplado a um detector de índice de refração RID-6A. Utilizou-se coluna linear PolySep (7,8 mm x 300 mm), fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, solução eluente aquosa de NaNO<sub>3</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>). O volume de amostra injetado foi 50 µL, com concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>.

### 1.3.9. Medidas de Intensidade de Luz Transmitida através das partículas

A LCST do PNIPAAm em partículas do hidrogel, obtidas contendo este polímero monômeros NIPAAm na formulação, foi medida baseando-se no método da luz transmitida conforme descrito por Crispim et al. (*Crispim, Rubira et al. 1999*). Um esquema do aparato utilizado está representado na Figura 1.1.

Em uma cela de vidro transparente, com camisa para controle de temperatura, foram adicionados 3 mL de uma solução tampão fosfato, pH 7, e cerca de 3 mg das partículas do hidrogel, de modo a obter concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>. As partículas de hidrogel intumesceram a temperatura ambiente por 2 h, aproximadamente, antes de iniciar as medidas.



**Figura 1.1** Esquema do aparato utilizado para a medida da luz transmitida através das partículas do hidrogel em função da temperatura.

Um banho termostatizado foi acoplado à cela e os experimentos foram conduzidos no interior de um caixa escura, completamente fechada, evitando assim, a interferência de luz espúria. Mediu-se a intensidade da luz transmitida através da amostra usando, como detector, um fotodiodo (EG&G

Optoelectronics, modelo HUV200B) acoplado a um multímetro. A intensidade de luz (proveniente de um laser He-Ne,  $\lambda = 632,8$  nm) transmitida através da amostra foi registrada em função da temperatura. As medidas foram realizadas, em triplicata, em temperaturas entre 25 °C e 45 °C. Antes de cada medida, a solução contendo as partículas de hidrogel foi deixada por aproximadamente 1 hora na temperatura desejada, para atingir o equilíbrio térmico.

### **1.3.10. Medidas de Magnetização**

As medidas de sensibilidade das partículas ao campo magnético foram realizadas no Instituto de Física da USP, São Paulo, em um magnetômetro de amostra vibrante (MAV) montado com eletroímã que gera um campo magnético controlável cuja intensidade máxima atingida é de 20 kOe.

As amostras, previamente pesadas, foram preparadas na forma de pastilhas e colocadas no extremo inferior da haste do MAV, o qual vibra a uma frequência de aproximadamente 100 Hz. Foram realizados ciclos de histerese com taxa de varredura do campo de 33 Oe/s a temperatura ambiente.

## CAPÍTULO II

## MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA

## 2.1. INTRODUÇÃO

As aplicações de polissacarídeos como biomateriais tem se destacado nos últimos anos, devido às propriedades únicas dessa classe de materiais (*Schuetz, Gurny et al. 2008*), (*Lee and Mooney 2012*), (*Fajardo, Lopes et al. 2012*). Os polissacarídeos são altamente estáveis, não tóxicos, hidrofílicos, biodegradáveis além de serem recursos abundantes na natureza, cuja transformação/modificação química pode ocorrer por várias formas e são, frequentemente, de baixo custo.

Diversos biopolímeros têm sido funcionalizados com metacrilatos, como a quitosana (*Amsden, Sukarto et al. 2007*), ácido siálico (*Woerly, Fort et al. 2008*), 2008), dextrana (*Desmedt, Lauwers et al. 1995*), (*Vandijkwolhuis, Franssen et al. 1995*), ácido hialurônico (*Oudshoorn, Rissmann et al. 2007*), inulina (*Vervoort, Van den Mooter et al. 1997*), goma arábica (*Reis, Guilherme et al. 2006*), amido (*Reis, Guilherme et al. 2008*), pectina (*Maior, Reis et al. 2008*).

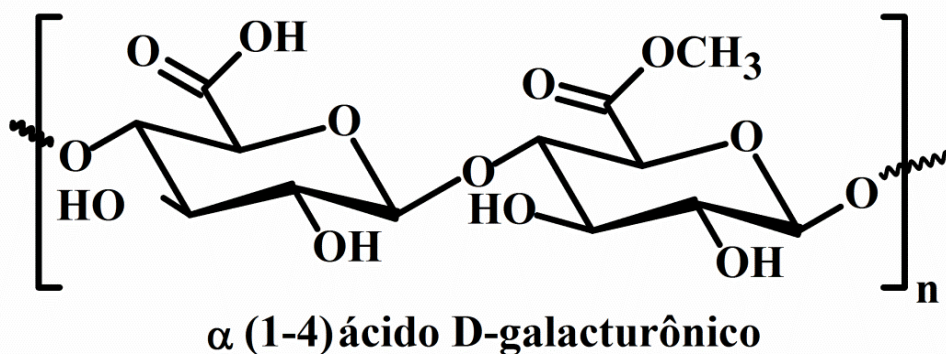
Os bio-macro-monômeros, como podem ser denominados os derivados metacrilatados de biopolímeros, são polimerizados e utilizados na preparação de hidrogéis e nanogéis, biodegradáveis, visando diversas aplicações como biomateriais em engenharia de tecidos, no desenvolvimento de dispositivos para liberação de fármacos, entre outros (*Oh, Lee et al. 2009*).

A reação de biopolímeros com metacrilatos visa adicionar, na estrutura daqueles, grupos vinílicos. Os grupamentos vinílicos então inseridos são usados para posterior reticulação e consequente formação de hidrogéis, por meio de ligações covalentes entre cadeias dos polímeros modificados. A formação de ligações cruzadas em derivados polissacarídicos tem grande importância na área farmacêutica, uma vez que as propriedades mecânicas dos hidrogéis são

melhoradas sem afetar, gravemente, a biodegradabilidade. Por serem os polissacarídeos hidrofílicos, a solubilidade destes em meio aquoso é reduzida pela formação da matriz tridimensional (3D), impedindo a liberação prematura de fármaco encapsulados na matriz 3D. Além disso, tornam-se susceptíveis a biodegradação enzimática pelas bactérias presentes no cólon (Reis, Guilherme et al. 2006).

A pectina é um polissacárideo complexo, heterogêneo, encontrado na parede celular primária da maioria das plantas. Devido à sua interação com outros componentes da parede celular a mesma auxilia na adesão entre células contribuindo para a firmeza, a resistência mecânica e a coesividade tecidual sendo considerada, portanto, o principal agente cimentante da parede celular (Rosenbohm, Lundt et al. 2003).

A estrutura predominante da pectina é uma cadeia polimérica linear composta por ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), conforme mostrado na Figura 2.1. Esta estrutura linear é ocasionalmente interrompida por cadeias laterais ricas em açúcares neutros, principalmente, arabinose, galactose, ramnose. Além disso, a pectina pode possuir diferentes graus de metilação, dos resíduos de ácido carboxílico, que são dependentes da fonte a partir da qual a pectina é isolada, bem como das condições utilizadas durante o isolamento e respectiva purificação (Rosenbohm, Lundt et al. 2003).



**Figura 2.1.** Unidade repetitiva da cadeia de uma pectina (Pec).

As pectinas são muito utilizadas em diferentes ramos industriais. Nas indústrias de alimentos são úteis como agentes de gelificação e de espessamento nos alimentos. Nas indústrias farmacêuticas são utilizadas em sistemas de liberação de fármacos devido à sua perfeita biocompatibilidade, resposta à variação do pH, que permite entrega cólon-específica. Além disso, acredita-se que a pectina contribui para a diminuição do nível de colesterol no sangue, auxilia a diminuição da absorção de glicose; facilita a excreção de toxinas e metais divalentes pela urina e têm atividade anti-tumoral. Adicionalmente aos benefícios já citados, a ingestão diária de pectina por seres humanos não tem limites ou contraindicações (*Ogonczyk, Siek et al. 2011*).

A crescente demanda industrial por pectinas com diferentes capacidades de gelificação ou de estabilização de frutas e de produtos lácteos aumenta a necessidade de obtenção de pectinas diferentes ou derivados com propriedades específicas para uma determinada aplicação (*Rosenbohm, Lundt et al. 2003*).

Vários derivados de pectina foram obtidos, reticulados (*Souto-Maior, Reis et al. 2010*), amidados (*Mishra, Datt et al. 2008*), tiolados (*Perera, Hombach et al. 2010*), e sulfatados (*Cipriani, Gracher et al. 2009*). As propriedades dos derivados ampliou as aplicações de pectinas, inicialmente da área alimentícia para outras áreas, sendo nestas utilizadas como dispositivos para liberação de fármacos (*Mishra, Datt et al. 2008*), (*Souto-Maior, Reis et al. 2010*), agentes antitrombóticos (*Cipriani, Gracher et al. 2009*), e agentes mucoadesivos (*Sharma and Ahuja 2011*).

Por outro lado, a inserção de grupos vinílicos na pectina por meio da modificação usando anidrido maleico não tem sido muito relatada e tampouco estudada. Quando comparado aos acrilatos, o anidrido maleico (AM) atrai maior interesse para a modificação da pectina devido à sua maior biocompatibilidade e alta reatividade do grupo anidrido (*Huang, Wang et al. 2010*).

O AM é um material facilmente acessível (*Yao, Mai et al. 2011*). Cerca de 1,7 milhões de toneladas de AM foram produzidos e consumidos em 2009. Mais de 40% desta produção foi

utilizada para a fabricação de poliésteres insaturados. A utilização de poliésteres insaturados em resinas, materiais compósitos, dispositivos biomédicos e dispositivos de liberação de medicamentos, permite melhorar as propriedades dos polímeros, por meio de modificações, pós-polimerização, das unidades maleato ou fumarato, oriundas do AM (*DiCiccio and Coates 2011*).

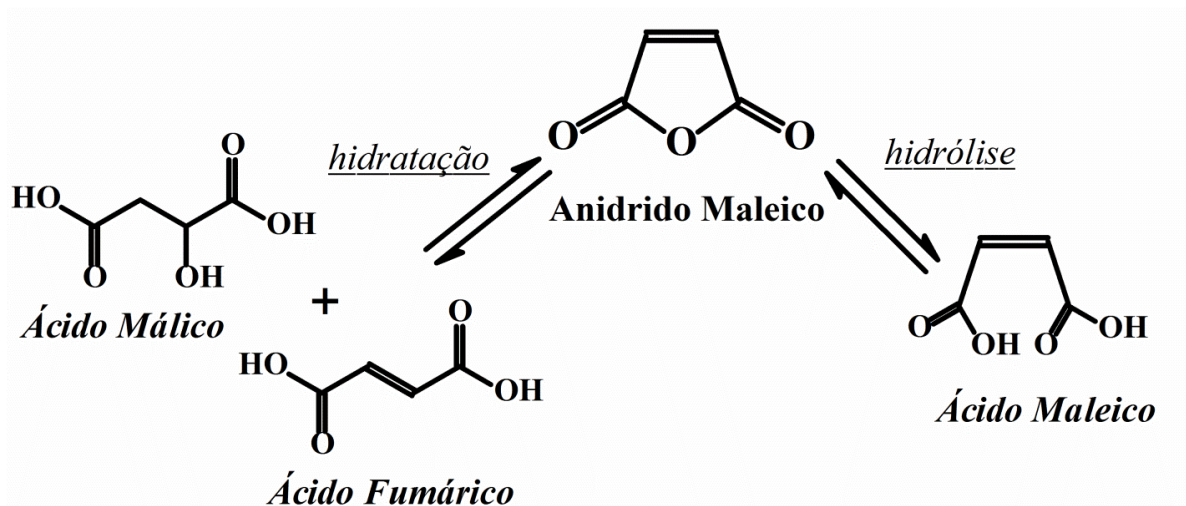
Poliésteres insaturados biodegradáveis, tais como o poli(propileno fumarato) (PPF), auxilia a formação de *scaffolds* de tecido ósseo e não é citotóxico. Portanto, podem ser usados em implantes ortopédicos e sistemas de reparação de tecidos. Embora os poliésteres insaturados sejam materiais com propriedades bem estabelecidas, os mesmos possuem aplicações limitadas, devido a incapacidade de incorporar funcionalidade diversificada na cadeia polimérica, dificuldade em atingir o peso molecular elevado e formação de ligações éter indesejáveis (*DiCiccio and Coates 2011*).

Copolímeros contendo produtos de modificação do AM têm sido considerados como materiais versáteis, possibilitando novas aplicações em diversas áreas da indústria. Por exemplo, copolímeros de AM com metacrilato de metila, com acetato de vinila ou com estireno, mostraram variadas atividades biológicas. Por exemplo, o copolímero anidrido maleico-estireno tem sido reconhecido por conferir atividade anti-tumoral (*Karakus, Yenidunya et al. 2011*).

Os copolímeros contendo AM têm sido frequentemente utilizados na preparação de polímeros funcionais. Uma vez que o AM é vulnerável ao ataque nucleofílico de grupos amino ou hidroxila, estes podem reagir com o AM por abertura de anel. Este processo aumenta o número de grupos ácido carboxílico disponíveis para possíveis modificações químicas. Além disso, a hidrólise completa dos grupos anidrido é muitas vezes acompanhada pela formação de ligações de hidrogênio, distribuídas ao longo da cadeia polimérica. É também importante ressaltar que a atividade antitumoral desses copolímeros de AM modificados tem se mostrado dependente da quantidade de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila e da natureza da distribuição ao longo das cadeias



laterais (Karakus, Yenidunya et al. 2011). Na Figura 2.2 encontra-se apresentada a estrutura do anidrido maleico e a estrutura dos respectivos produtos de hidratação e hidrólise.



**Figura 2.2.** Anidrido Maleico (AM) e reações de hidratação e hidrólise.

Na literatura encontram-se alguns trabalhos que incorporam a estrutura do AM em diferentes polissacarídeos para diferentes aplicações. Um exemplo disso é o hidrogel baseado em colágeno, obtido via copolimerização entre o AM, os grupos mono-amida ligados ao colágeno e grupos metacrilato de 2-hidroxietila (Potorac, Popa et al. 2012). Outros exemplos são: i) partículas esféricas de géis de amido-maleato obtidas após irradiação UV em solução de nitrato de amônio de cério (IV), precipitado em etanol absoluto, sob condições controladas (Tay, Pang et al. 2012); ii) um hidrogel de amido e PVA reticulado usando o AM como agente de reticulação, para melhorar as propriedades mecânicas e comportamento de intumescimento dos hidrogéis formados (Pang, Chin et al. 2011); iii) a obtenção da celulose modificada com AM na ausência de solvente aplicada na adsorção cátions a partir de soluções aquosas na interface sólido/líquido (de Melo, da Silva et al. 2009).

A modificação da pectina com AM, proposta nesta Dissertação, foi realizada por meio de metodologia adaptada dos trabalhos de Hamcerencu e colaboradores, nos quais esses promoveram,

respectivamente, a modificação da goma de xantano e goma de gelano por meio de reação com AM (*Hamcerencu, Desbrieres et al. 2007, Hamcerencu, Desbrieres et al. 2008*).

Nesta Dissertação, a modificação é realizada visando a inserção de grupamentos vinílicos, oriundos da estrutura do AM. Além disso, há a formação de ligações éster estáveis e a presença de grupos ácido carboxílicos terminais. De acordo com Melo, Biswas e colaboradores materiais com estas características são viáveis para aplicações em indústrias de revestimento, de cosméticos, de alimentos, farmacêutica e para membranas de separação de anticorpos, enzimas, proteínas, etc (*de Melo, da Silva et al. 2009*), (*Biswas, Shogren et al. 2006*),

## 2.2. OBJETIVOS

- Inserir grupamentos vinílicos na estrutura da pectina, por meio de reação com anidrido maleico (AM);
- Caracterização da pectina modificada (PecAM) por meio de FTIR, RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS), GPC, TGA/DTG, DRX e MEV.

## 2.3. EXPERIMENTAL

### 2.3.1. Materiais

Pectina-USP (Pec) e tubos para diálise 32 mm de diâmetro, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha); N,N dimetilformamida P.A.-ACS, (DMF), álcool etílico absoluto P.A. e acetona P.A., foram fornecidos pela F. Maia (Brasil) e o anidrido maleico (AM) foi adquirido da Vetec (Brasil).

### 2.3.2. Procedimentos

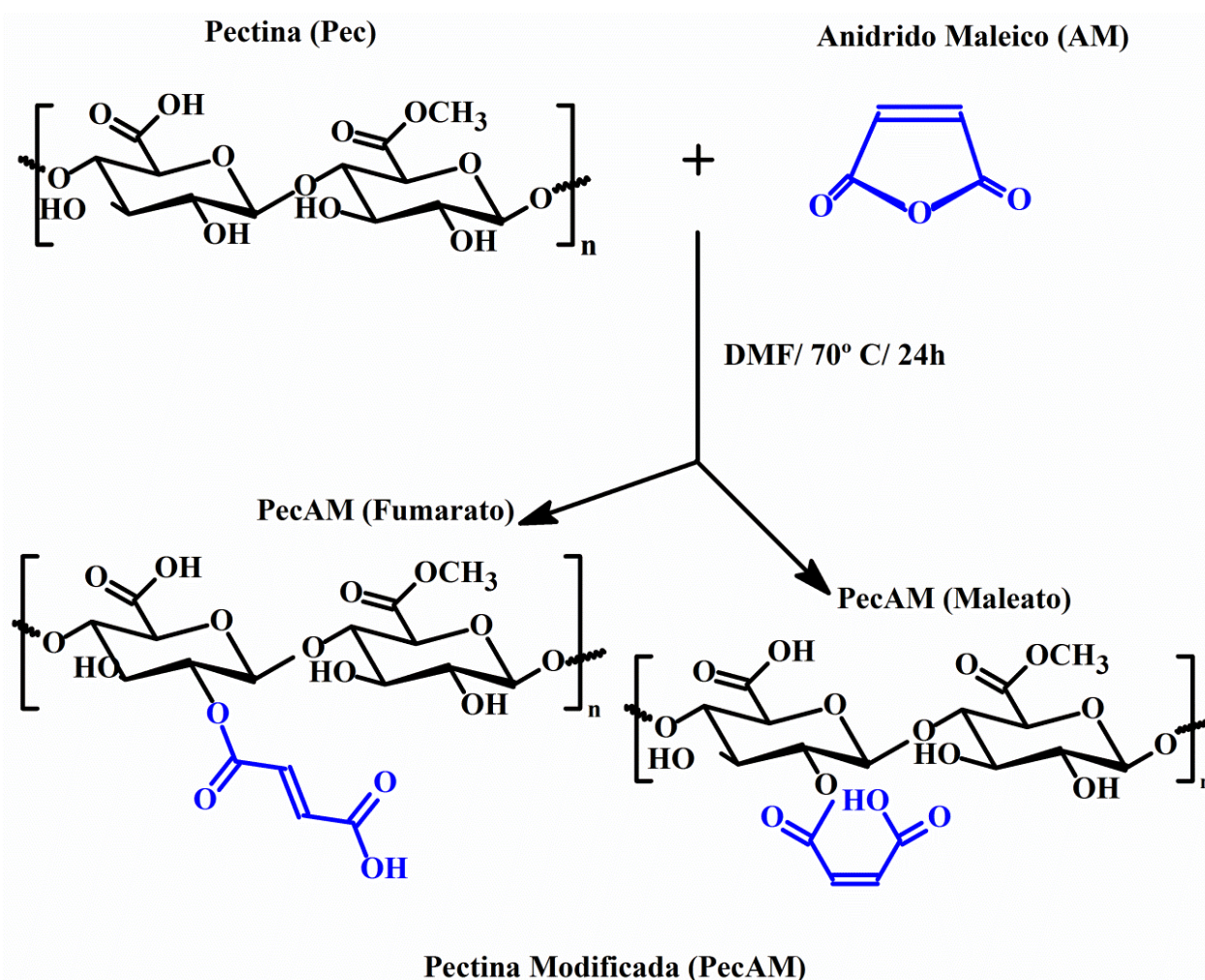
Primeiramente, foi realizada a secagem da Pec e do AM em estufa sob pressão reduzida por 10 h a 40 °C. Soluções de Pec (0,1 % m/v) e AM (0,2 % m/v) foram preparadas, separadamente, em DMF, sob agitação por 12 h, a temperatura ambiente e na ausência de umidade. Após, a solução de AM foi adicionada gota a gota à solução de Pec, que permaneceu sob agitação constante. A relação em massa de AM:Pec usada foi 3:1. A reação foi então submetida ao aquecimento (70 °C) e mantida nestas condições por 24 h, seguindo procedimento descrito na literatura (*Hamcerencu, Desbrieres et al. 2007*).

Por adição gota a gota da solução aquosa de PecAM em acetona (ou em etanol) sob agitação, a pectina modificada (PecAM) foi precipitada e, após, separada por filtração usando funil de Buchner. Após, foi redissolvida em água e colocada em tubos de celulose para diálise. O processo de diálise ocorreu durante seis dias, realizando duas trocas diárias da água destilada que envolvia os tubos. Finalmente, a PecAM dialisada foi congelada e seca em liofilizador a -55 °C (Liofilizador Alpha 1-2 LDplus, Christ) e caracterizada por FTIR, RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-CP/MAS), GPC, TGA/DTG, DRX e MEV seguindo os procedimentos já descritos na seção 1.3.

## 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grupos hidroxila presentes nas estruturas de polissacarídeos são suscetíveis a reações de esterificação. A reatividade da hidroxila ligada a um anel glicosídico é afetada principalmente pela sua posição. Em geral, as hidroxilas que se encontram ligadas ao carbono 6 (C6) ou na posição equatorial do anel glicosídico são as mais reativas (Liu 1988, Carey 2000). Dependendo do meio em que ocorre a reação de modificação, é proposto que os grupos hidroxila presentes no biopolímero atuem como agentes nucleofílicos. No caso do anidrido maleico (AM), sugere-se que os grupos hidroxila do biopolímero atacam os grupos carbonila do AM e desestabilizam o anel do AM (Hamcerencu, Desbrieres et al. 2007). Uma vez que o anel do AM se abre, o mesmo pode se ligar na estrutura do biopolímero em duas diferentes formas isoméricas: fumarato (na forma *trans*) e maleato (na forma *cis*), como esquematizado na Figura 2.3, sendo que ambas as formas isoméricas podem ocorrer em um mesmo processo de modificação. Ainda, os grupos retiradores presentes podem afetar a fração de uma ou de outra forma de isomerização, de acordo com o seu respectivo potencial de remover elétrons; fração essa que depende, também, do impedimento estérico causado por esses grupos. No entanto, a forma fumarato é a mais estável (de Melo, da Silva et al. 2009).

No espectro FTIR da Pec, Figura 2.4., pode-se destacar a absorção em regiões características, como a banda larga centrada em aproximadamente  $3430\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento de ligações O-H típicas de polissacarídeos. A banda centrada em  $2940\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de ligações C-H dos grupos  $\text{CH}_3$ . Por fim, observa-se na região entre  $1600$  e  $1800\text{ cm}^{-1}$  a existência de duas bandas. A primeira banda centrada em  $1750\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação C=O dos grupos carboxílicos protonados (COOH) e dos grupos carboxílicos esterificados com o grupo metila (COOCH<sub>3</sub>). E a segunda banda, centrada em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , é devida a estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C=O de carboxilatos.



**Figura 2.3.** Esquema da reação de modificação da pectina (Pec) com anidrido maleico (AM).

Abaixo de  $1500\text{ cm}^{-1}$  encontra-se uma região na qual as bandas resultam da interação de vários sistemas vibracionais complexos. Por isso, muitas vezes nesta região os sinais são atribuídos com ambiguidade. Essa região é chamada *finger print*, única para cada composto. Nesta região estão as bandas correspondentes às vibrações típicas dos polissacarídeos, como as vibrações do anel piranóide sobrepostas com as vibrações de estiramento dos grupos (C-OH) e as vibrações da ligação glicosídica (C-O-C) (Sinitsya, Copikova et al. 2000), (Synytsya, Copikova et al. 2003), (Coimbra, Ferreira et al. 2011).

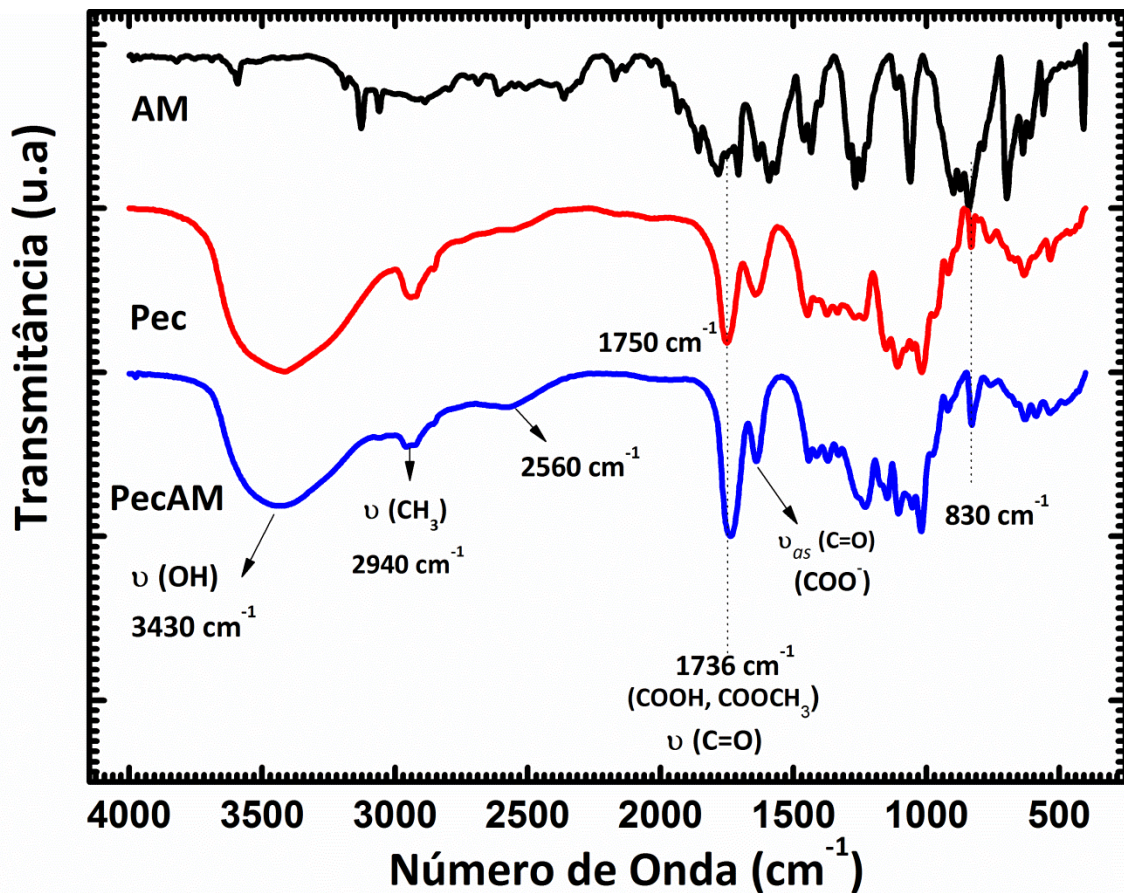
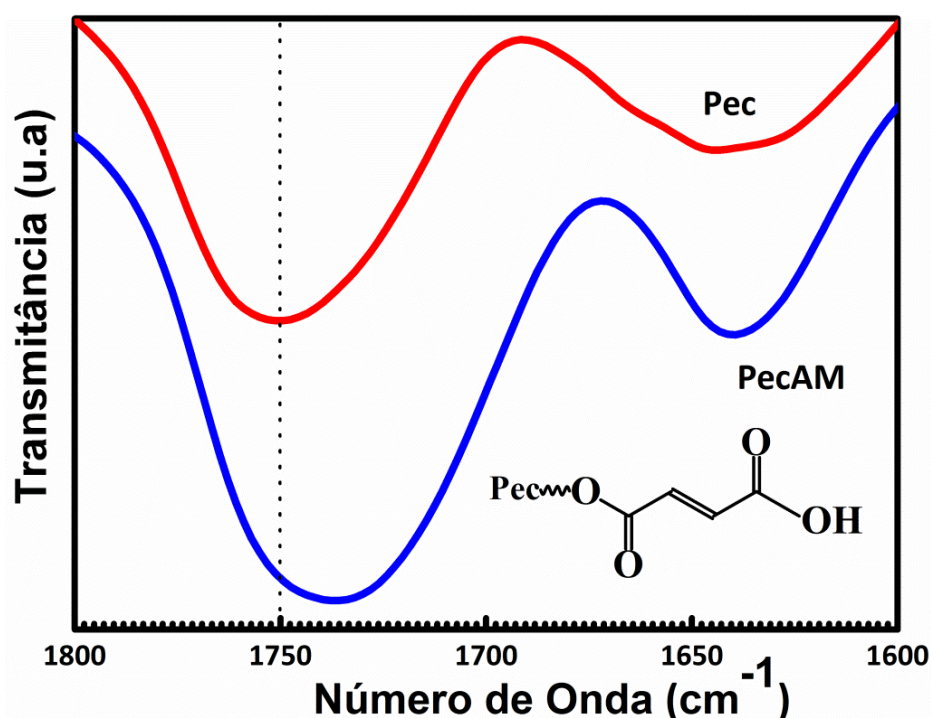


Figura 2.4. Espectros FTIR: do AM, da Pec, e do produto da modificação (PecAM).

A partir da comparação dos espectros FTIR da Pec e da PecAM é possível perceber poucas e discretas alterações. Pôde-se inferir, por exemplo, a presença de bandas atribuídas a carbonos vinílicos, C=C, na PecAM devido ao deslocamento da banda, larga, centrada em  $1750\text{ cm}^{-1}$  no espectro FTIR da Pec para  $1736\text{ cm}^{-1}$  no espectro da PecAM, indicando a presença de sistema éster conjugado na PecAM, oriundo da estrutura do AM. Uma ampliação dos espectros FTIR da Pec e PecAM na região 1800 a 1600 é mostrada na Figura 2.5.



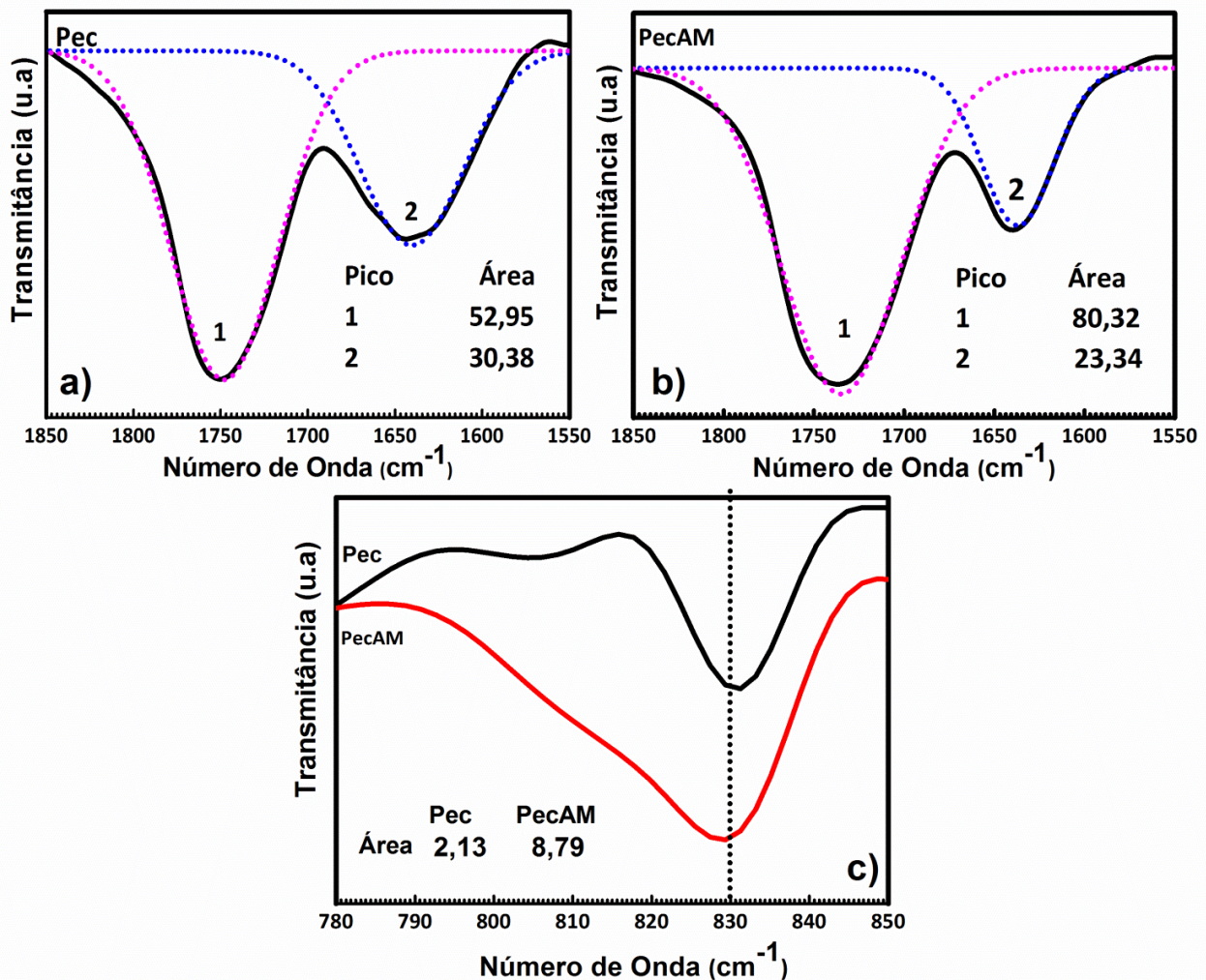
**Figura 2.5.** Espectro FTIR: da Pec e da PecAM, região de 1800-1600  $\text{cm}^{-1}$ . O deslocamento da banda de carbonila indica a presença de sistema éster conjugado na PecAM.

É evidente que a quantidade de grupos COOH aumentou após a inserção de maleato/fumarato na estrutura da Pec. Portanto, é possível confirmar a modificação da Pec por meio da medida das áreas referentes aos grupos COOH nos espectros FTIR da Pec e da PecAM.

Foram feitas integrações das bandas atribuídas aos grupos COOH como mostrado na Figura 2.6.a-b. As áreas relativas aos grupos COOH, pico 1, foram 52,95 para Pec e 80,32 para a PecAM. O aumento da quantidade de grupos COOH ainda é reforçado pelo aumento da área referente à deformação fora do plano desses grupos que aparece em  $830 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 2.6.c) que passa de 2,13 no espectro da Pec para 8,79 no espectro da PecAM. Por outro lado, nota-se que a área relativa aos grupos carboxilato, pico 2 (Figura 2.6.a-b), diminui após o processo de modificação. Tal fato pode ser atribuído à formação de ligações de hidrogênio, devido à hidrólise dos grupos anidrido, as quais podem atribuir ao polímero modificado uma possível atividade antitumoral, como já relatado anteriormente (Karakus, Yenidunya et al. 2011). As ligações de hidrogênio podem ser observadas

pelo ombro em  $2550\text{ cm}^{-1}$  existente no espectro da PecAM e atribuído à formação de dímeros de ácido carboxílico (de Melo, da Silva et al. 2009), (Pavia 2010).

É possível observar ainda alterações na região entre  $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , as quais correspondem a vibrações dos grupos hidroxila ligados ao anel glucopiranosose. Esses grupos são muito sensíveis a qualquer mudança na vizinhança dos grupos pendentes. Desta forma, quando a reação de modificação ocorre nas hidroxilas do anel glucopiranosose da Pec, como é sugerido, as alterações nesta região tornam-se evidentes (de Melo, da Silva et al. 2009).



**Figura 2.6.** Espectros FTIR: a) área relativa a COOH e COO<sup>-</sup> da Pec, b) área relativa a COOH e COO<sup>-</sup> da PecAM, c) área relativa COOH, deformação fora do plano da Pec e PecAM



Também foram feitas análises por meio de ressonância magnética de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). Na Figura 2.7 são apresentados espectros, obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$ , de RMN  $^1\text{H}$  da PecAM, da Pec e do AM. Embora os espectros RMN  $^1\text{H}$  não apresentem ótima resolução, como desejado, a partir dos mesmos é possível confirmar a ocorrência da reação de modificação.

A análise de polissacarídeos por meio da técnica de RMN  $^1\text{H}$  em geral apresenta complexidade devido à quantidade de sinais gerados e, por isso, a interpretação dos mesmos se torna difícil. Além disso, as amostras de pectina possuem natureza heterogênea e, em água deuterada, apresentam elevada viscosidade. No entanto, a técnica de RMN  $^1\text{H}$  tem sido utilizada em combinação com técnicas de degradação química e/ou enzimática para a investigação da estrutura deste polissacarídeo, revelando-se uma ferramenta útil na elucidação da composição e da estrutura das zonas ramificadas e do grau e padrões de metilação nas zonas lineares das pectinas (Rosenbohm, Lundt et al. 2003) (Winning, Viereck et al. 2007).

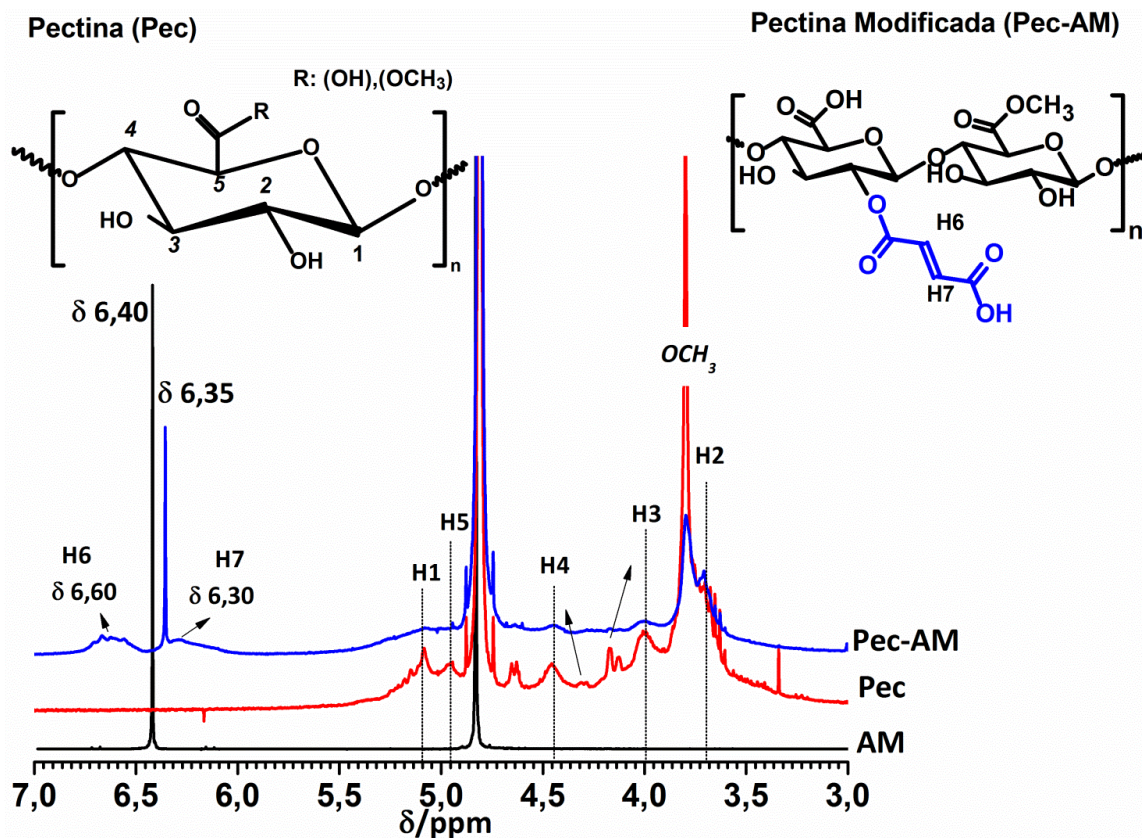


Figura 2.7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da PecAM, Pec e AM, obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz.

De acordo com os espectros RMN  $^1\text{H}$  obtidos nesta dissertação e comparados com a literatura, foi possível atribuir o sinal em  $\delta$  3,78 ppm aos átomos de hidrogênio dos grupos metoxila das unidades de ácido galacturônico esterificadas ( $\text{COOCH}_3$ ), e os sinais em  $\delta$  3,70,  $\delta$  3,98 e  $\delta$  4,44 ppm atribuídos, respectivamente, aos átomos de hidrogênio H2, H3 e H4 do ácido D-galaturônico que se mantêm praticamente inalterados quando a unidade de ácido galacturônico se encontra esterificada (Morris, Hromadkova et al. 2002), (Rosenbohm, Lundt et al. 2003), (Tamaki, Konishi et al. 2008), (Winning, Viereck et al. 2007), (Mukhiddinov, Khalikov et al. 2000). Por outro lado, os sinais relativos aos átomos de hidrogênio H1 e H5 alteram-se significativamente conforme a unidade de ácido galacturônico é esterificada (AGalMe) ou não (AGal), sendo ainda influenciados pelas unidades vizinhas. O átomos de hidrogênio H1 presentes em unidades de AGal apresentam sinal entre  $\delta$  5,06-5,16 ppm, enquanto que nas unidades AGalMe, o sinal desloca-se para a região de  $\delta$  4,97-4,92 ppm (Renard and Jarvis 1999). Já os átomos de hidrogênio H5 presentes em unidades AGal apresentam sinal entre 4,5-4,7 ppm e em unidades de AGalMe este sinal desloca-se para 4,9-5,1 ppm, conforme a natureza das unidades vizinhas (de Souza, de Carvalho et al. 2009).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da PecAM confirma a ocorrência da reação de modificação também pelo aparecimento de dois sinais atribuídos a átomos de hidrogênio ligados a carbonos vinílicos,  $\text{C}=\text{C}$ , em  $\delta$  6,60 e  $\delta$  6,30 ppm. O sinal em  $\delta$  6,60 ppm foi atribuído aos hidrogênios vinílicos adjacentes ao grupo éster (H6) e o sinal em  $\delta$  6,30 ppm aos hidrogênios vinílicos adjacentes aos grupamentos ácido carboxílico (H7) (Hamcerencu, Desbrieres et al. 2007), (Pavia 2010).

O sinal em  $\delta$  6,35 ppm pode ser atribuído a presença de ácido maleico residual (AM em água), porém isto não interfere na análise aqui realizada, pois o ácido maleico apresenta simetria em relação ao grupo vinílico, e por isso origina um único sinal em  $\delta$  6,35 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Portanto, os sinais em  $\delta$  6,60 e  $\delta$  6,30 ppm são atribuídos unicamente aos grupamentos vinílicos inseridos nas cadeias da Pec. O grau de substituição (GS) foi determinado por meio do espectro de

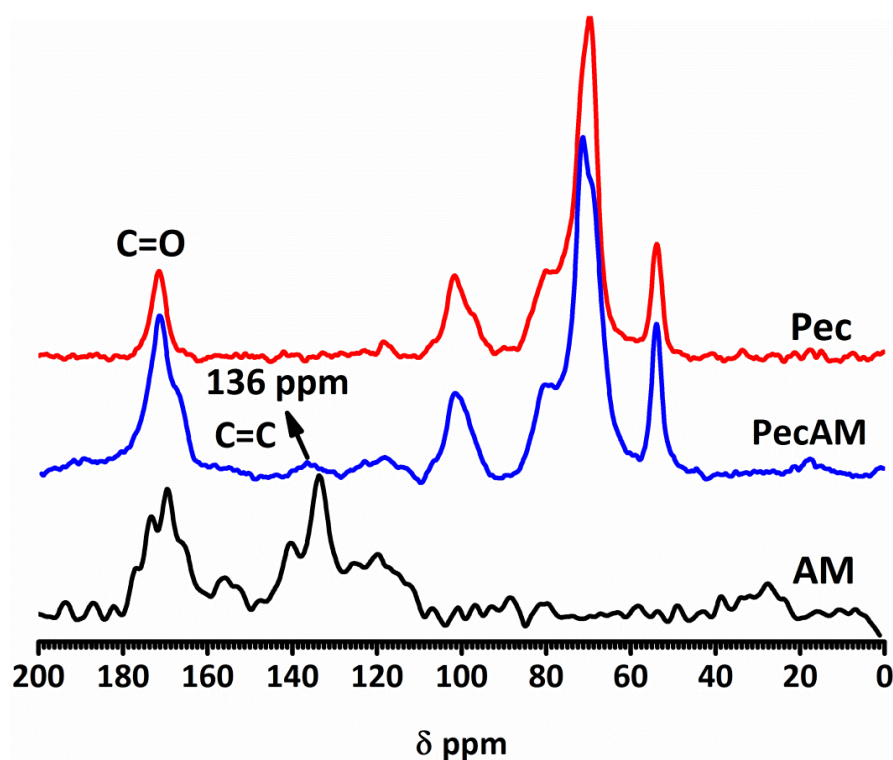
RMN  $^1\text{H}$ , considerando as áreas obtidas por integração dos sinais H6 (vinílico) e H4, da unidade galacturônica, respectivamente, Figura A1 (ANEXO).

**Tabela 2. 1.** Valor do grau de substituição da PecAM.

	$\delta$ ppm	ÁREA
<b>H6</b>	6,46	23,75
<b>H4</b>	4,40	76,25

Considerando a sensibilidade associada à técnica de RMN, a heterogeneidade e a alta viscosidade das amostras de Pec e de acordo com os valores obtidos, pode-se considerar que o GS está em torno de 24,0 %.

A técnica de RMN  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS (estado sólido) foi utilizada como técnica complementar para confirmar a reação de modificação. Com esta foi possível observar no espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS da PecAM, Figura 2.8, o aparecimento de um sinal em  $\delta$  136 ppm, referente aos carbonos vinílicos incorporados na estrutura da Pec por meio da reação com AM.



**Figura 2.8.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS no estado sólido da Pec, PecAM e AM.

Foi realizada a análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) das amostras de Pec e de PecAM para a avaliação da massa molar. Na Figura 2.9 estão apresentados os cromatogramas obtidos. Os perfis de eluição observados são similares, indicando que as amostras possuem uma distribuição de pesos moleculares e polidispersidade semelhantes. A análise por meio de GPC permitiu a determinação da massa molar média da Pec,  $MM = 2,9 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  ( $VE = 9,413 \text{ mL}$ ), enquanto que a massa molar média é alterada no processo de modificação da Pec, passando para  $MM = 2,3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , ( $VE = 9,552 \text{ mL}$ ).

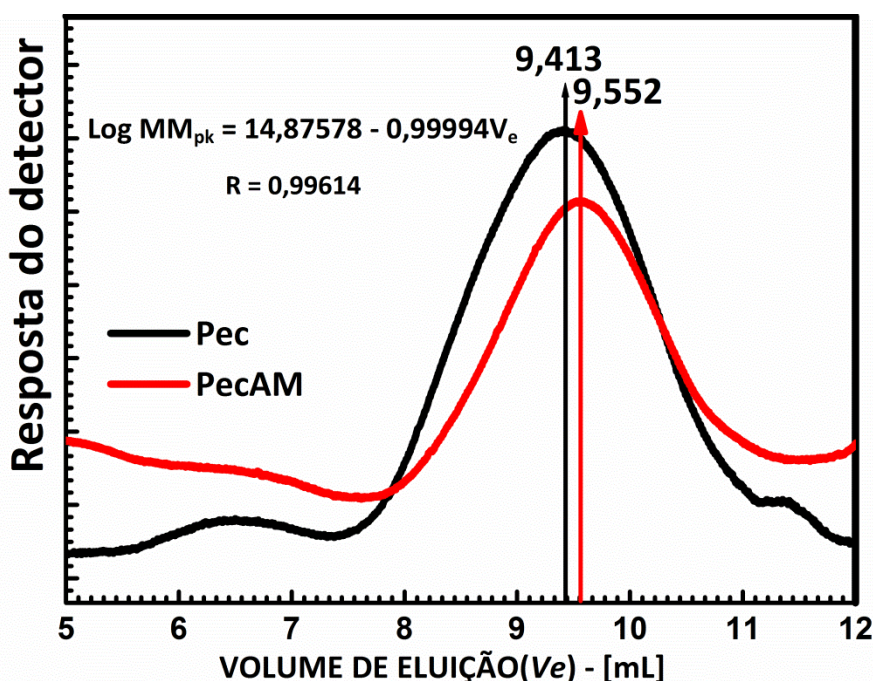


Figura 2.9. Perfil de eluição de Pec e PecAM, obtidos por GPC.

Quanto à redução da massa molar, sugere-se que cadeias da PecAM podem sofrer cisão durante a reação de modificação. Outra razão para a redução da massa molar seria atribuída à introdução dos grupos metacrilatos, o que pode conduzir a alteração do comportamento em solução da PecAM se comparado à Pec. Por exemplo, a introdução de grupos hidrofóbicos leva a um rompimento no balanço entre forças atrativas e repulsivas, intra e intermoleculares, estabelecidas entre as moléculas do polímero em solução. Desta forma, a Pec e a PecAM podem apresentar

diferentes estruturas e conformações supramoleculares, o que pode resultar na alteração do perfil de eluição do derivado obtido (Coimbra 2010)

O comportamento térmico também foi avaliado e as respectivas curvas de TG e DTG são apresentadas na Figura 2.10. As curvas de TG e DTG mostram a existência de dois eventos térmicos distintos. O primeiro evento compreende o intervalo de 25-160 °C, relacionado à perda de água nas amostras. É importante notar que as amostras apresentaram ligeira diferença no conteúdo de água. A Pec apresentou 9,7% e a PecAM 7,7% de água, em massa. Apesar de pequena, esta diferença é outro indicativo da maior hidrofobicidade da PecAM em relação a Pec. O segundo evento, referente à maior perda de massa, foi atribuído à degradação dos polímeros que ocorreu entre 220-320 °C. A Figura 2.10 mostra que o ponto de inflexão da curva de TG da Pec ocorre em (250 °C) temperatura menor do que a observada para a PecAM (268 °C) demonstrando que o processo de modificação melhora a estabilidade da pectina, o que está de acordo com relatos na literatura (DiCiccio and Coates 2011). No entanto, a degradação da PecAM se inicia em temperaturas menores que a observada na Pec.

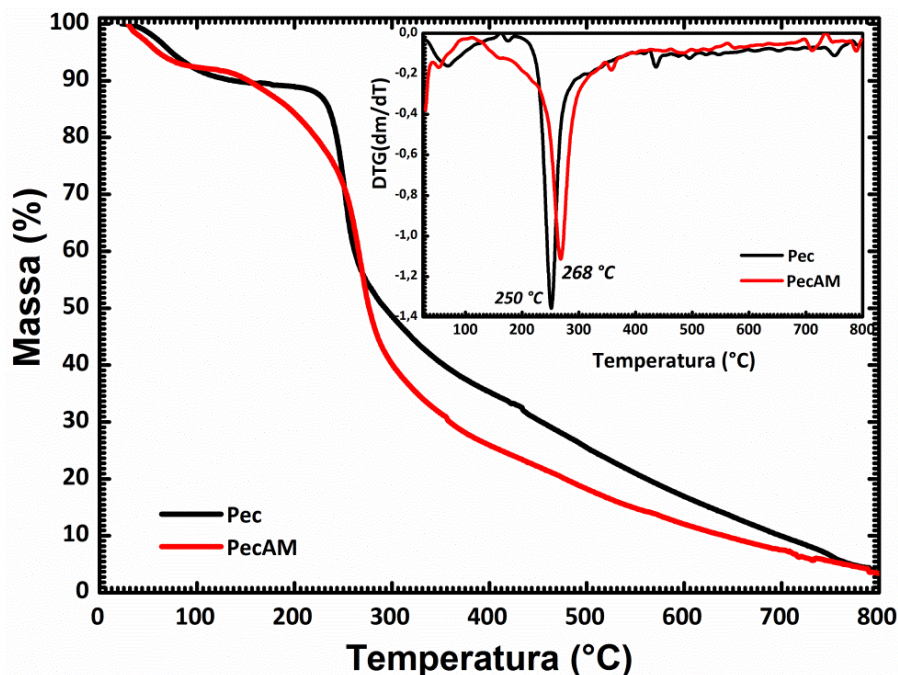


Figura 2.10. Curvas de TG e a primeira derivada (DTG) (*inset*) para a Pec e PecAM.

Os difratogramas de raios-X (DRX) do AM, da PecAM e da Pec, apresentados na Figura 2.11, revelaram, também, evidências da ocorrência da modificação da Pec. No difratograma da Pec, podem ser observados três sinais de baixa intensidade ( $2\theta = 13^\circ$ ,  $21^\circ$  e  $29^\circ$ ), dois deles alargados ( $2\theta = 13^\circ$  e  $21^\circ$ ) que foram atribuídos à baixa cristalinidade da Pec. No perfil de DRX da PecAM não aparecem os sinais em  $2\theta = 13^\circ$  e  $21^\circ$ . Observa-se, no entanto, neste difratograma um halo centrado em  $2\theta = 21,5^\circ$  e, além disso, há o surgimento de um sinal estreito e de maior intensidade em  $2\theta = 31,6^\circ$  não observado no difratograma da Pec, mas presente no difratograma do AM. Este sinal pode estar relacionado a regiões de ordem devido a possíveis ligações de hidrogênio entre os grupamentos -COOH, oriundos da estrutura do AM, que se organizam formando dímeros de ácido carboxílico, fornecendo à estrutura polimérica um maior ordenamento (*de Melo, da Silva et al. 2009*). Assim, tais indícios sugerem que essas alterações possam ser atribuídas às mudanças na estrutura da Pec devido ao processo de modificação.

O maior ordenamento e, conseqüentemente, a maior cristalinidade é observada no difratograma do AM. Neste é possível verificar que os sinais são estreitos. Cabe destacar a existência no difratograma do AM de alguns sinais de maior intensidade em  $2\theta = 20,5^\circ$ ,  $22^\circ$ ,  $26^\circ$  e o sinal acima mencionado em  $2\theta = 31,6^\circ$ .

Aplicando-se a lei de Bragg, Equação 2.1, é possível calcular as distâncias periódicas (d) presentes nas estruturas da Pec, da PecAM e do AM. Os valores são apresentados na Tabela 2.2.

$$\lambda = 2 d \sin (\theta) \quad \text{(Equação 2.1)}$$

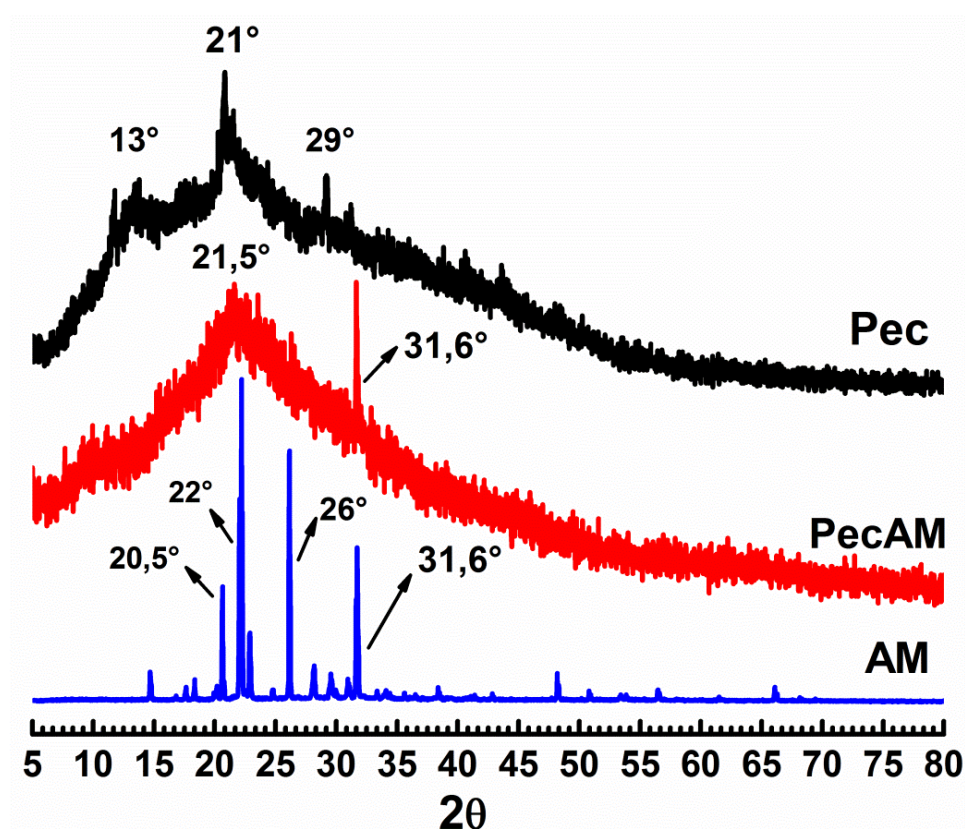


Figura 2.11. Difratogramas de DRX da Pec, da PecAM e do AM.

**Tabela 2. 2.** Valores das distâncias periódicas ( $d$ ) na estrutura da Pec, da PecAM e do AM obtidas por DRX após aplicação da Equação (2.1).

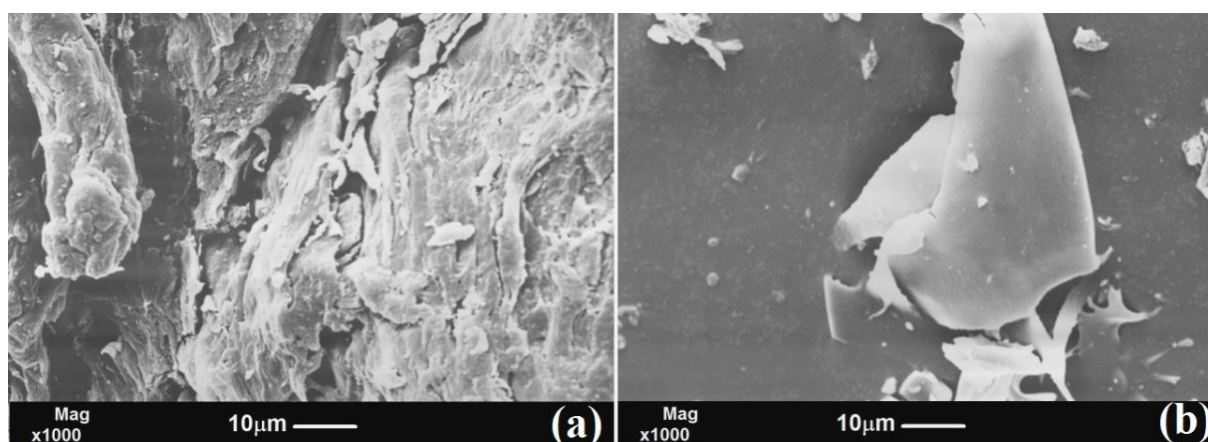
AMOSTRA	$2\theta$ ( $^{\circ}$ )	$d$ ( $\text{\AA}$ )
AM	14,7	6,01
	20,5	4,33
	22	4,04
	22,8	3,90
	26,0	3,42
	28,2	3,16
	31,6	2,83
Pec	13,0	6,80
	21,0	4,23
	29,0	3,08
PecAM	21,5	4,12
	31,6	2,83

As medidas de potencial zeta revelaram que a densidade de cargas negativas nas cadeias da PecAM é maior que nas cadeias Pec. O potencial de superfície da PecAM é -22,8 mV enquanto que o potencial de superfície da Pec é -13,0 mV. Esta diferença foi relacionada à maior quantidade de grupos carboxílicos na PecAM provenientes da estrutura do AM que foram inseridos na Pec. Além disso, os diâmetros hidrodinâmicos médios das cadeias de Pec e de PecAM, medidos em solução, são bem diferentes, como mostrado na Tabela 2.3.

**Tabela 2. 3.** Valores de diâmetro hidrodinâmico médio e de PecAM, em solução. Os valores foram obtidos por meio do equipamento Zetasizer Nano ZS com laser de He-Ne ( $\lambda = 633$  nm) em um ângulo fixo de  $173^\circ$ .

AMOSTRA	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)
Pec	$463 \pm 16$	$-13,0 \pm 0,5$
PecAM	$91 \pm 19$	$-22,8 \pm 1,3$

Além disso, a morfologia da Pec (Fig. 2.12.a) e da PecAM (Fig. 2.13.b) são bem diferentes, como mostrado nas imagens obtidas por MEV. Observa-se que a Pec possui um aspecto mais rugoso e os fragmentos são maiores. No entanto, após a modificação os fragmentos da PecAM são menores e a superfície apresenta maior homogeneidade e de aspecto mais liso se comparada à superfície da Pec.



**Figura 2.12.** Imagens obtidas por MEV: (a) da Pec e (b) da PecAM.



## 2.5. CONCLUSÕES

A PecAM foi obtida, com sucesso, por meio da reação da Pec com AM em condições específicas. As análises espectroscópicas de FTIR, RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS) confirmaram a ocorrência da reação e o grau de substituição (GS = 24 %) determinado por meio de RMN  $^1\text{H}$ . Além disso, foram observadas alterações nas propriedades antes e após a modificação. As análises por meio de GPC mostraram que a PecAM possui menor massa molar que a Pec, possivelmente, devido à cisão de cadeias durante a reação de modificação ou a mudanças nas interações entre a PecAM e a solução eluente que influenciaram no resultado de GPC. Por outro lado, análises de TGA/DTG revelaram que a PecAM possui estabilidade térmica ligeiramente maior que a Pec original. A análise de DRX revelou que a modificação afetou a organização em relação ao material original. O perfil de DRX da PecAM é significativamente alterado em relação ao perfil de DRX da Pec. A PecAM possui menor organização em relação a Pec. Porém o perfil de DRX da PecAM apresentou um sinal bastante evidente em  $2\theta = 31,6^\circ$  presente no perfil de DRX do AM. Finalmente, as análises de MEV e de potencial zeta mostraram mudanças na morfologia e no potencial de superfície que foram atribuídas ao processo de modificação. Os fragmentos maiores e de aspecto rugoso presentes na superfície da Pec tornaram-se menores na PecAM cuja superfície se tornou mais lisa. A superfície da Pec apresentou potencial zeta igual a  $-13,0 \pm 0,5$  mV e a PecAM apresentou o valor de  $-22,8 \pm 1,3$  mV, fato atribuído ao maior número de grupos carboxílicos na estrutura da PecAM.

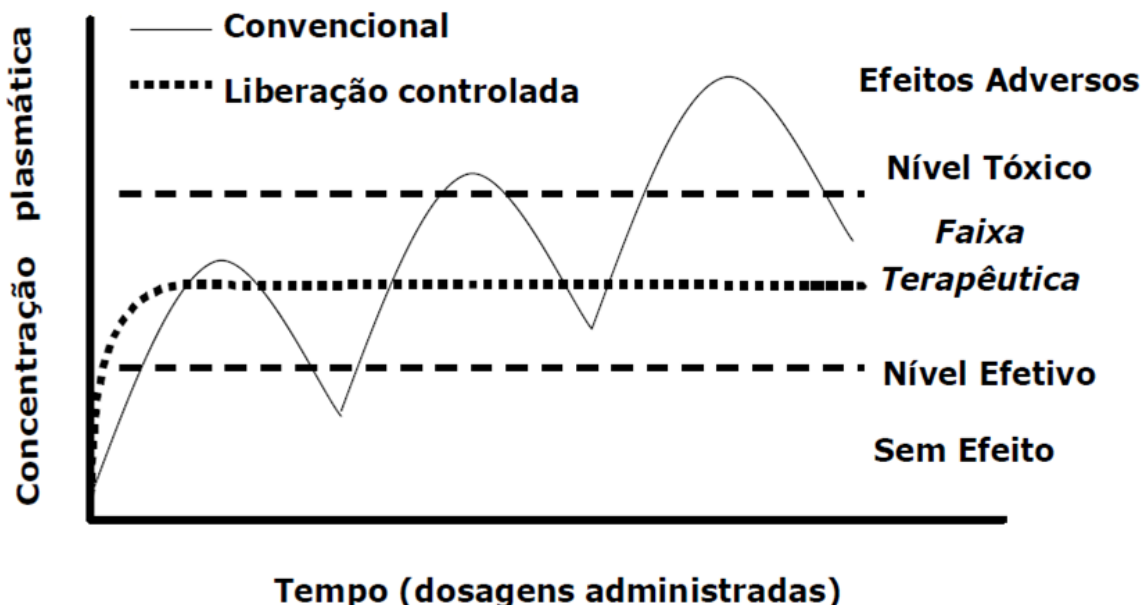
**CAPÍTULO III**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PECTINA MODIFICADA**

**3.1. INTRODUÇÃO**

**3.1.1. Sistemas de liberação de fármacos**

A administração periódica de fármacos por meio de dispositivos convencionais, como comprimidos de liberação imediata (ou não controlada), pode resultar em constante alteração das concentrações plasmáticas, com períodos alternados entre ineficácia e toxicidade. Por outro lado, sistemas de liberação controlada têm sido desenvolvidos com o objetivo de manter uma concentração plasmática no corpo dentro da faixa terapêutica do fármaco por um longo período de tempo, controlando a sua taxa de liberação e/ou entrega. Na Figura 3.1 é ilustrada uma comparação dos perfis de liberação de medicamentos administrados de forma convencional e medicamentos de taxa liberação controlada.



**Figura 3. 1.** Perfil de liberação estabelecido por sistemas de administração convencional vs sistemas de liberação controlada.

A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas para liberação de fármacos é de vital importância para o futuro da medicina e para a saúde do indivíduo. A liberação controlada de fármacos melhora a biodisponibilidade, a absorção e impede a degradação prematura do composto ativo, mantêm a concentração do fármaco na faixa terapêutica, controlando a taxa de liberação e reduzindo os efeitos adversos e pode direcioná-lo para a liberação “*in situ*” (Zhang, Chan et al. 2013).

As inovações na química de materiais relacionadas a sistemas de liberação de fármacos se iniciaram com o desenvolvimento de dispositivos transportadores de compostos ativos, biodegradáveis, biocompatíveis e sensíveis a estímulos externos, como pH, força iônica, temperatura, entre outros (Kost and Langer 2012). No entanto, na última década, descobertas revelaram que o tamanho (muitos deles na escala nanométrica) e a forma desses dispositivos (frequentemente esféricos) desempenham um importante papel para o controle da liberação e podem ajudar no transporte de ativos biológicos, contribuindo para o desenvolvimento da nanotecnologia na área biomédica e farmacêutica (Zhang, Chan et al. 2013).

O tamanho das partículas tem um impacto significativo sobre o seu tempo de circulação. Para aplicações intravenosas as partículas devem possuir tamanho entre nanômetros até alguns poucos micrômetros, pois as vias intravenosas não podem ser obstruídas. Por isso, partículas com tamanhos maiores que 1,5  $\mu\text{m}$  devem ser evitadas para este fim (Moghimi, Hunter et al. 2001). Quando injetadas por via intravenosa, as partículas menores que 20 nm são eliminadas da circulação, dentro de algumas horas, através do sistema retículo endotelial enquanto as maiores ficam retidas, no fígado e baço, poucos minutos após a administração (Schipper, Iyer et al. 2009). Além disso, estudos indicam que partículas menores do que 500 nm são normalmente internalizadas por endocitose e as partículas maiores do que 500 nm por fagocitose (Rejman, Oberle et al. 2004). Por outro lado, estudos recentes indicam que células endoteliais possuem capacidade de internalizar

partículas muito grandes (5  $\mu\text{m}$ ) por meio de endocitose (Muro, Garnacho et al. 2008), (Gratton, Ropp et al. 2008). Já para o caso de tratamento de tumores, partículas com tamanho inferior a 250 nm são preferidas devido à maior probabilidade de penetração no tecido endotelial (Decuzzi, Lee et al. 2005), (Nie, Xing et al. 2007).

As pesquisas recentes também revelaram claramente que a geometria das partículas tem papel significativo na liberação direcionada de fármacos (Doshi and Mitragotri 2009), (Champion, Katare et al. 2007). Partículas de diferentes formas geométricas experimentam diferentes forças hidrodinâmicas enquanto fluem através da vasculatura. As partículas esféricas não se desviam de seu movimento a menos que elas experimentem a influência de força(s) externa(s) (Petros and DeSimone 2010), (Decuzzi, Pasqualini et al. 2009). Por outro lado, partículas não esféricas são susceptíveis à sedimentação e ao torque, resultando em maior tendência de se moverem em direção à parede dos vasos sanguíneos, fenômeno designado como marginalização (Decuzzi, Lee et al. 2005), (Decuzzi, Pasqualini et al. 2009).

Partículas discoides, de forma elíptica, demonstraram inibir a fagocitose em uma orientação particular, enquanto partículas cilíndricas alongadas exibiram maior resistência em comparação com a fagocitose de partículas esféricas de mesmo volume (Champion and Mitragotri 2009), (Geng, Dalhaimer et al. 2007). As partículas alongadas apresentam maior razão superfície/área de contato e capacidade de direcionamento correspondentemente mais alta em comparação com partículas esféricas. Portanto, podem exibir maior acumulação no tecido alvo. Além disso, estudos têm demonstrado que partículas alongadas migram lentamente para o núcleo e com orientação tangencial única em comparação com partículas esféricas, que viajam relativamente rápido e exibem empacotamento hexagonal na célula (Yoo, Doshi et al. 2010).

### 3.1.2. Hidrogéis

Um grande número de pesquisadores têm se esforçado para desenvolver sistemas eficientes de liberação de fármacos. Neste quesito, os hidrogéis têm atraído considerável atenção (Hoffman 2012). Hidrogéis pertencem a uma classe de materiais constituídos de uma grande variedade de estruturas e propriedades. Dentre estes, os hidrogéis utilizados como dispositivos de liberação controlada de fármacos tem se destacado entre os sistemas de entrega inteligentes (Hoffman 2002), (Peppas, Hilt et al. 2006), (Bhattarai, Gunn et al. 2010).

Os hidrogéis são redes poliméricas insolúveis formadas a partir de ligações químicas/físicas cruzadas entre homo ou copolímeros. Sua estrutura tridimensional (3D) exibe compatibilidade termodinâmica com água, pois são altamente hidrofílicos e capazes de absorver grandes quantidades de água, de soluções aquosas ou de fluidos biológicos (Peppas, Bures et al. 2000).

Depois dos anos 1960, quando Wichterle O. & Lim D. usaram o poli(2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) reticulado como material para obtenção de uma lente de contato macia (Wichterle 1960), os hidrogéis tornaram-se objetos de estudos de um grande número de pesquisadores de diversas áreas. Desde então, o número de trabalhos referentes à essa classe de materiais, hidrogéis, vêm crescendo significativamente (Gupta, Vermani et al. 2002).

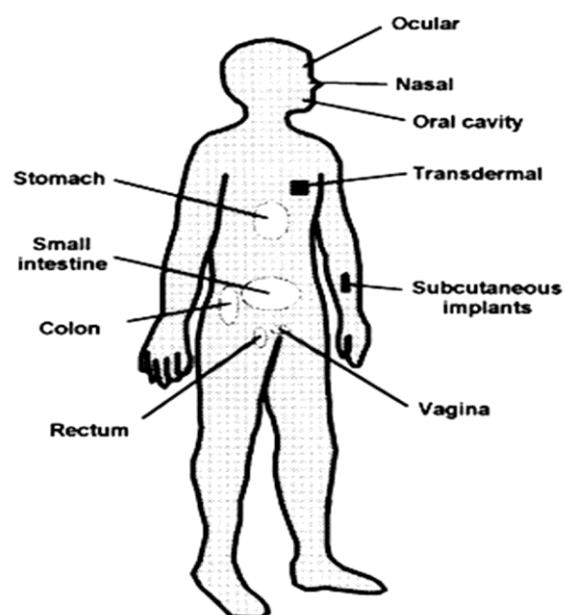
Quando intumescida, uma matriz polimérica hidrofílica possui ao menos 20% em peso de água, mas a quantidade de água pode alcançar até 99% (Deligkaris, Tadele et al. 2010). A sua capacidade de reter grandes quantidades de água contribui para sua excelente biocompatibilidade, consistência macia e elástica, que se assemelha aos tecidos vivos, apresentando utilidade para uma grande variedade de aplicações na indústria farmacêutica e biomédica (Van Vlierberghe, Dubruel et al. 2011).

A rede tridimensional, reticulada, formada por ligações covalentes, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, ou interações físicas, protege o fármaco contra ambientes hostis tal

como presença de enzimas ou grande acidez ou basicidade, e pode ainda atuar no controle da liberação de fármaco, alterando a estrutura do gel em resposta a estímulos ambientais (*Qiu and Park 2012*).

Atualmente há grande interesse no desenvolvimento de hidrogéis inteligentes. Eles são concebidos para responder a alterações no seu ambiente químico e/ou físico. Entre os estímulos químicos/bioquímicos estão o pH, a força iônica e eventos específicos de reconhecimento molecular, enquanto entre os estímulos físicos estão a temperatura, campo elétrico e/ou magnético, composição do solvente, luz, pressão e som. Os hidrogéis inteligentes têm sido usados para diversas aplicações como músculos artificiais, válvulas químicas, imobilização de enzimas e células, entre outros. Além disso, as matrizes de hidrogéis são materiais versáteis, podendo exibir uma variedade de formas físicas, por exemplo, placas, micropartículas, nanopartículas, revestimentos e filmes (*Hoare and Kohane 2008*).

Sistemas de liberação de fármacos baseados em hidrogéis podem ser administrados por via oral, retal, ocular, epidermal e aplicação subcutânea. A Figura 3.2, publicada no trabalho de Peppas e colaboradores, ilustra os locais disponíveis para a aplicação de hidrogéis para liberação de fármacos (*Peppas, Bures et al. 2000*).



**Figura 3. 2.** Localização de tecidos aplicáveis em sistemas de liberação de fármacos baseados em hidrogel. (Peppas, Bures et al. 2000).

Dentre a ampla gama de polímeros que têm sido utilizados na síntese de hidrogéis, os polissacárideos recebem destaque devido às vantagens em relação aos polímeros sintéticos (Bouyer, Mekhloufi et al. 2012), (Paulino, Guilherme et al. 2006). Os polissacarídeos são abundantes e disponíveis a partir de fontes renováveis, tais como as algas, plantas, culturas microbianas, bem como por meio de técnicas de DNA recombinante. Desta forma, os polissacarídeos possuem grande variedade na composição e nas propriedades. Além disso, a facilidade da sua produção torna os polissacarídeos relativamente mais baratos do que os polímeros sintéticos (Coviello, Matricardi et al. 2007).

Microgéis/nanogéis, à base de biopolímeros, atraíram, recentemente, grande interesse nas aplicações em engenharia de tecidos e liberação de fármacos (Liu, Jiao et al. 2008); (Agnihotri, Mallikarjuna et al. 2004); (Nanjawade, Manvi et al. 2007). Microgéis são hidrogéis particulados com dimensões situadas na escala micrométrica. Se são ainda menores, na escala nanométrica, as partículas são denominadas nanogéis.

Assim como os hidrogéis macroscópicos, os micro/nanogéis possuem alto teor de água, biocompatibilidade e propriedades química e mecânica compatíveis para seu uso na área de biomateriais. Além disso, eles possuem tamanho ajustável de submicrons até dezenas de nanômetros, com grande área superficial para bioconjugação multivalente e uma rede interior com dimensão adequada para a incorporação de agentes terapêuticos (Oh, Lee et al. 2009).

Vários métodos de reações de polimerização heterogênea de monômeros hidrofílicos ou solúveis em água na presença de agentes de reticulação tem sido utilizados para preparar micro e nanogéis. Muitos destes métodos utilizam o processo de polimerização radicalar e incluem dispersão, precipitação, (mini)emulsão inversa e microemulsão inversa (Oh, Drumright et al. 2008).

Neste trabalho foi utilizada a técnica de polimerização em emulsão inversa (sistema água/álcool benzílico) induzida por ultrassom, para a obtenção de matrizes de hidrogel da PecAM utilizando o PVA como agente estabilizante. A hipótese avaliada é que as matrizes obtidas usando as metodologias adotadas nesta Dissertação tenham características adequadas para serem utilizadas como dispositivos de liberação controlada de medicamentos.

### 3.2. OBJETIVOS

- Síntese de microgéis de PecAM por polimerização em emulsão inversa, utilizando diferentes condições tais como: PVA de diferentes massas molares (PVA10 e PVA22) e em diferentes concentrações; diferentes proporções água/álcool benzílico, diferentes tempos de reação e duas diferentes amplitudes de ondas de ultrassom;
- Caracterização físico-química das partículas, por meio de FTIR, RMN <sup>1</sup>H, TGA/DTG, DRX e MEV;
- Análise das melhores condições de obtenção de sistemas microparticulados em função das propriedades avaliadas na sua caracterização.



### 3.3. EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. Materiais

Persulfato de sódio (PS) P.A. e Polivinil álcool (PVA10, 80% hidrolisado, MM média 9000-10000 g mol<sup>-1</sup>, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Álcool benzílico (AB) P.A. e acetona P.A. foram fornecidos pela F. Maia (Brasil). N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) foi proveniente da Vetec (Brasil). Polivinil álcool (PVA22, 88% hidrolisado, MM média 22.000 g mol<sup>-1</sup>) foi adquirido da Across Organics (EUA). PecAM dialisada, MM=2,3 x 10<sup>5</sup> g mol<sup>-1</sup>, foi obtida como descrito no Capítulo 2 desta dissertação.

#### 3.3.2. Procedimentos

##### 3.3.2.1. Preparação das micropartículas de PecAM

As sínteses das micropartículas foram realizadas segundo metodologia adaptada do trabalho de Maurício e colaboradores em sistema de emulsão (água/AB) induzida por ultrassom, sob atmosfera de N<sub>2(g)</sub> em banho de gelo (Maurício, Guilherme et al. 2012). Para cada síntese, a fase aquosa foi preparada a partir da adição dos polímeros (PecAM e PVA) em água destilada sob agitação, a 50° C. Em seguida, 12 ml da fase aquosa, homogênea e resfriada, foi adicionada gota a gota a 36 ml da fase AB, sob atmosfera de N<sub>2(g)</sub> e sonicação (Ultrasonic Processor Ultraschallprozessor, UP200S, Hielscher Ultrassound Technology). O PS e o TEMED, usados respectivamente como iniciador e catalisador da reação de formação de radicais livres, foram adicionados após a obtenção de emulsão estável (aproximadamente 5 min). O sistema foi mantido sob sonicação e atmosfera de N<sub>2(g)</sub> por mais 15 min.

### 3.3.2.2. Avaliação da influência das condições utilizadas na formação de microesferas

Realizou-se um estudo para avaliar a influência da concentração e massa molar do PVA, utilizado como agente estabilizante, na geometria, morfologia e tamanho das partículas de PecAM formadas na reação em microemulsão inversa. Para tal estudo, a proporção AB/água, foi mantida constante em 3/1 (v/v), bem como as quantidades de PS e TEMED em 1,5 e 1,0%, respectivamente, em relação à massa de PecAM. A reação de polimerização ocorreu com tempo total de 20 min, e amplitude das ondas de ultrassom em 100%.

A concentração de PVA foi mantida em 0, 3,0 e 30,0% em relação a massa de PecAM. Além disso, avaliou-se a influência da massa molar do PVA (usou-se PVA10 ou PVA22) para a formação das partículas. As condições utilizadas para este estudo estão apresentadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3. 1.** Condições utilizadas para o estudo da influência do PVA e de sua massa molar na obtenção de microesferas de PecAM.

Amostras	PecAM (% m/v)	PVA10(% m/m)	PVA22(% m/m)
<b>μP0</b>	2,5	0	0
<b>μP1</b>	2,5	0	3,0
<b>μP2</b>	2,5	3,0	0
<b>μP3</b>	2,5	0	30,0

Para a avaliação de outras variáveis, tal como tempo de reação, proporção AB:H<sub>2</sub>O e da amplitude das ondas de ultrassom na geometria, morfologia e tamanho das partículas de PecAM formadas por microemulsão inversa, foram utilizadas as condições descritas na Tabela 3.2. Neste caso, manteve-se constante a concentração do PVA (3,0% em relação à massa de PecAM) e utilizou-se somente o PVA22.

**Tabela 3. 2.** Condições utilizadas para o estudo da influência do tempo de reação, da proporção AB:H<sub>2</sub>O e da amplitude das ondas de ultrassom na preparação de micropartículas de PecAM.

<b>Amostras</b>	<b>Proporção AB:H<sub>2</sub>O (v/v)</b>	<b>Tempo de reação (min)</b>	<b>Amplitude (%)</b>
<b>μP4</b>	3:1	35	100
<b>μP5</b>	4:1	20	100
<b>μP6</b>	3:1	20	80

### 3.3.2.3. *Purificação das micropartículas*

A emulsão contendo as partículas foi adicionada, gota a gota, sobre acetona gelada, razão acetona:emulsão 4:1 (v/v). Após, o sistema foi mantido sob refrigeração durante 24 h e, posteriormente, centrifugado. O precipitado foi lavado com acetona, repetidas vezes, colocado sob pressão reduzida a temperatura ambiente por 24 h e finalmente liofilizado a -55 °C por 24 h.

## 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.4.1. *Influência da concentração e massa molar do PVA*

Para exercer sua função, o estabilizante de emulsão deve permanecer na interface formada pela superfície das partículas sólidas e o meio contínuo. Assim, é necessário que o estabilizante tenha natureza anfifílica. Frequentemente, os estabilizantes anfifílicos utilizados na polimerização em dispersão/emulsão são homopolímeros, copolímeros bloco, copolímeros por enxertia (*graft copolymers*) e macromônômeros. Os macromônômeros e copolímeros bloco/enxerto são, normalmente, mais eficazes do que os homopolímeros. Contudo, os homopolímeros anfifílicos são amplamente utilizados em polimerização em dispersão, uma vez que têm menores custos de produção (*Hong, Hong et al. 2007*).

A escolha do estabilizante para a polimerização em dispersão/emulsão é baseada nas afinidades químicas entre os monômeros e estabilizantes e entre estes e a fase contínua. Devido à sua versatilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e baixo custo, o PVA é um material adequado para ser aplicado como estabilizante em reações de polimerização em dispersão/emulsão (*Hong, Hong et al. 2007*).

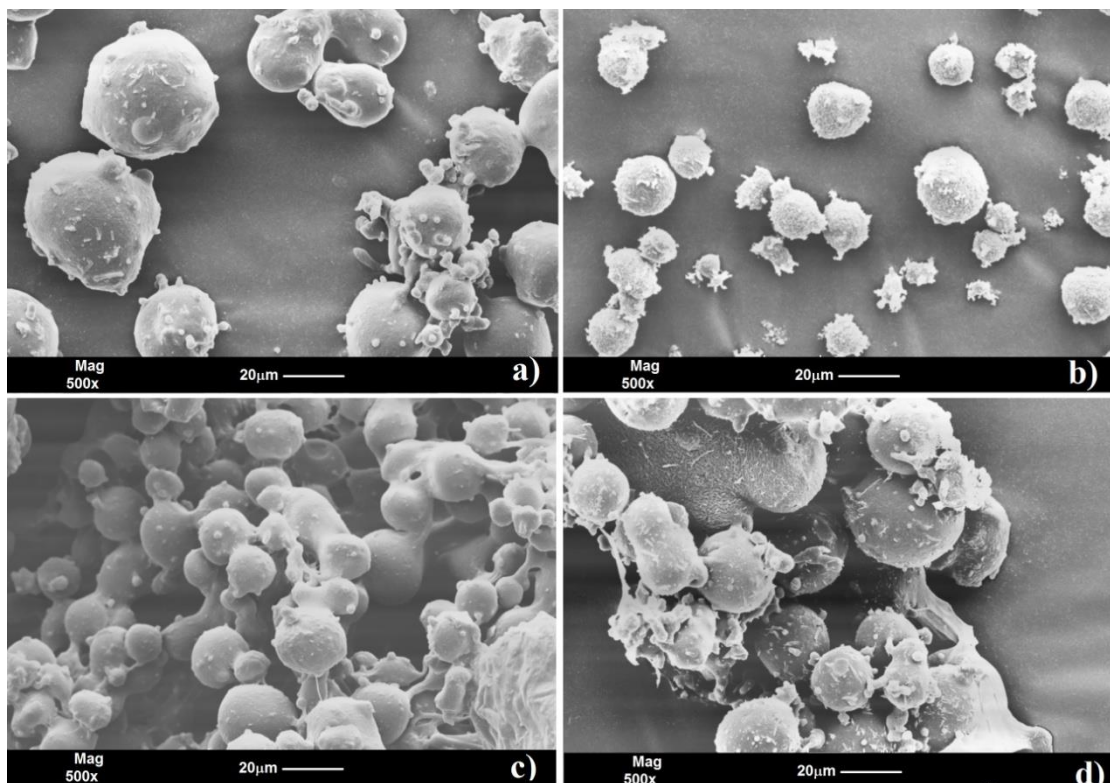
Na polimerização em emulsão, o estabilizante possui um papel importante na estabilidade e reologia da emulsão e, por consequência, no controle do tamanho das partículas obtidas. Em alguns casos, um estabilizante polimérico estérico, tal como o PVA, pode ser usado unicamente ou em combinação com outros agentes tensoativos (*Kim, Sudol et al. 2004*). O PVA tem sido usado com sucesso como estabilizante estérico na polimerização em dispersão de anilina, metacrilato de metila, estireno e de ácido acrílico (*Kim, Sudol et al. 2003, Kim, Sudol et al. 2004, Kim, Lee et al. 2006*).

O PVA é obtido por meio da hidrólise do poli(acetato de vinila) (PVAc). Por isso, é disponível comercialmente como copolímero aleatório de unidades de álcool vinílico e de acetato de vinila. Desta forma, a presença dos grupos de acetato de vinila residuais da hidrólise parcial do PVAc fornecem o caráter anfifílico ao PVA, de forma que os grupos de acetato de vinila interagem favoravelmente com os grupos orgânicos, enquanto os grupos álcool vinílico interagem favoravelmente com a água (*Lee, Tsai et al. 2010*).

O PVA pode ser fisicamente adsorvido ou covalentemente enxertado na superfície das partículas formadas durante a polimerização. É esperado que as partículas de microgel com PVA enxertado ou adsorvido apresentem estabilidade significativamente melhorada em comparação com as partículas coloidais estabilizadas apenas eletrostaticamente. Isto permite que as partículas obtidas na presença de PVA possam ser empregadas em ampla faixa de temperatura, pH e força iônica, incluindo condições fisiológicas onde microgéis convencionais geralmente flocculam (*Lee, Tsai et al. 2010*).

A polimerização em emulsão formada por álcool benzílico/água e usando PVA como agente estabilizante foi favorável para a formação de microgéis com geometria esférica (Reis, Guilherme et al. 2011). Tal geometria pode ser associada ao movimento aleatório das gotículas de água para a fase de AB, causado pela elevada velocidade de agitação. Assim, em altas velocidades de agitação deve haver a formação de uma emulsão de configuração múltipla álcool benzílico-água-álcool benzílico, dentro da qual o polímero é estável.

Nas imagens obtidas por MEV apresentadas na Figura 3.3 podem ser observadas microesferas obtidas nas diferentes condições de estudo empregadas e descritas na Tabela 3.1. Pode ser observado que ocorreu a formação de microesferas de PecAM na ausência de PVA, Figura 3.3.a, o que pode ser atribuído à capacidade de biopolímeros atuarem, em alguns casos, como estabilizantes em emulsões, formando uma rede polimérica prolongada na fase contínua, tornando-a altamente viscosa, podendo até mesmo formar um gel (Bouyer, Mekhloufi et al. 2012).

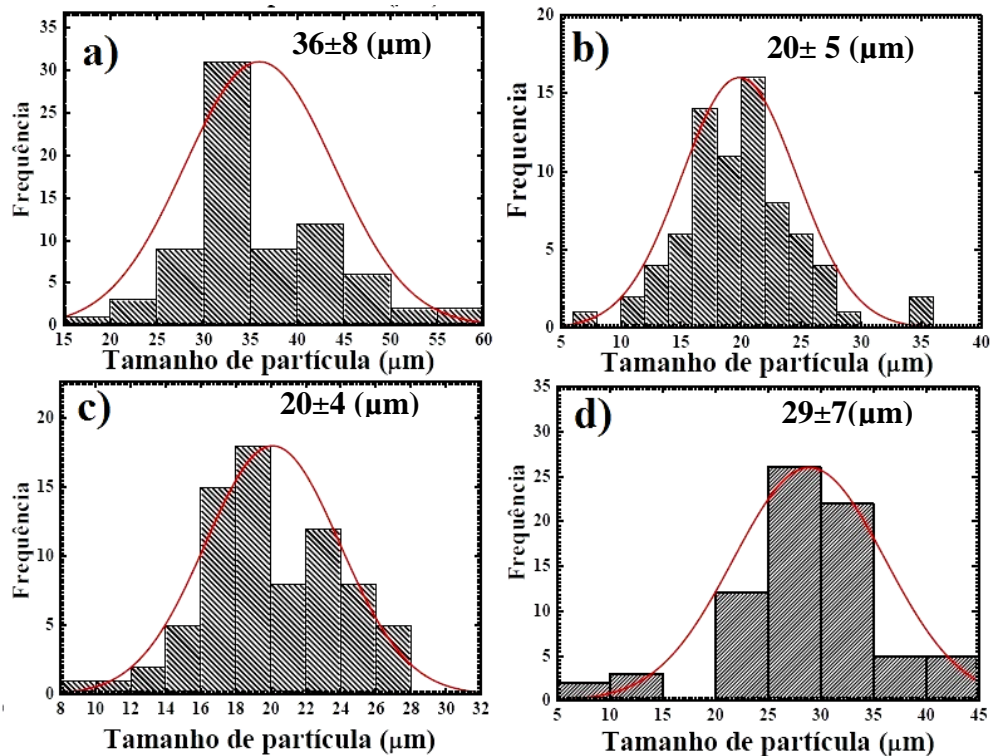


**Figura 3. 3.** Imagens obtidas por MEV de: (a)  $\mu$ P0, sem PVA; (b)  $\mu$ P1, PVA22 3,0%; (c)  $\mu$ P2, PVA10 3,0%; (d)  $\mu$ P3, PVA22 30,0%.

Apenas alguns polissacarídeos (entre eles a pectina) possuem propriedades de superfície que permitem sua adsorção na interface água-óleo (*Dickinson 2009*). A pectina é capaz de produzir emulsões estáveis da mesma maneira como a goma arábica (*Leroux, Langendorff et al. 2003*); (*Siew and Williams 2008*). A massa molar, os conteúdos residuais de proteínas, de ácido ferúlico, de ácido acético, de éster metílico e a sua acessibilidade à superfície das gotículas de óleo contribuem para as propriedades de emulsificação de pectinas (*Dickinson 2003*).

Com a adição do PVA ao sistema observa-se que as microesferas passam a apresentar geometria esférica melhor definida. No caso da adição de 3,0% m/m de PVA22, PVA de maior massa molar, são formadas microesferas individuais com superfície rugosa, Figura 3.3.b, enquanto que se adicionada a mesma quantidade do PVA10, PVA de massa menor molar, há a formação de microesferas aglomeradas e com superfície mais lisa, Figura 3.3.c. Fato semelhante ocorreu com a adição de 30,0% de PVA22 (Figura 3.3.d).

A influência do PVA no tamanho médio e na distribuição de tamanho das microesferas pode ser observada pela análise das imagens obtidas por MEV cujos histogramas são apresentados na Figura 3.4. O tamanho médio e a distribuição de tamanho das partículas foram calculados a partir da análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando o programa para captura e análise de imagens, IMAGE PRO-PLUS, versão 4.5.1 da Media Cybernetics, baseando-se na medida aleatória de 75 partículas de cada amostra, Figura 3.4.

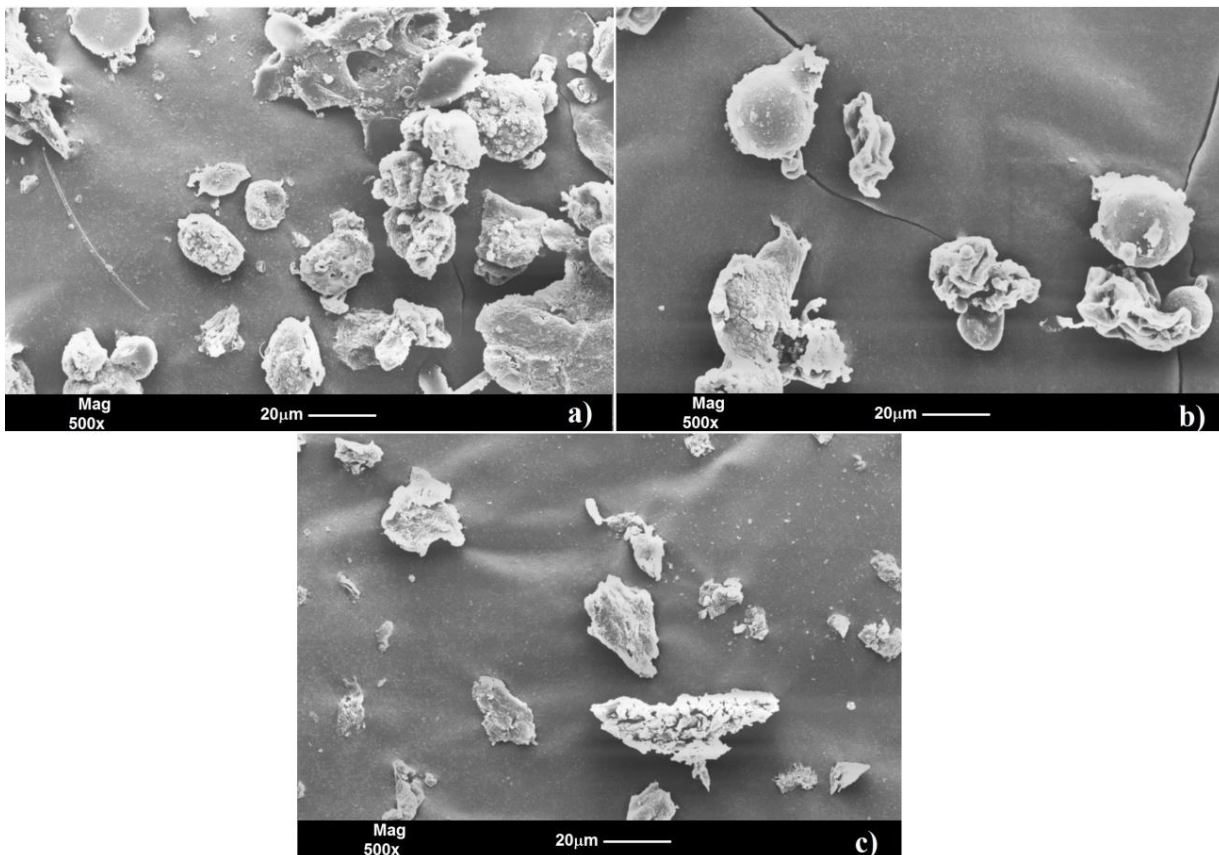


**Figura 3.4.** Tamanho médio e distribuição de tamanho das microesferas. (a)  $\mu P_0$ ; Sem PVA, (b)  $\mu P_1$ , PVA22 3,0%, (c)  $\mu P_2$ , PVA10 3,0%, (d)  $\mu P_3$ , PVA22 30,0%.

De acordo com a análise das Figuras 3.3 e 3.4, verifica-se que a adição de 3,0% de PVA22 é adequada (em termos de concentração e massa molar) para a obtenção de microesferas com menor tamanho médio e distribuição mais estreita de tamanho. Assim, foi considerado que o PVA22, na concentração de 3,0% m/m, atuou de forma eficaz para obtenção de uma emulsão adequada para a preparação de micropartículas esféricas de PecAM.

#### 3.4.2. Influência do tempo de reação, proporção AB:H<sub>2</sub>O e a amplitude das ondas de ultrassom.

A análise das imagens de MEV, Figura 3.5, mostra que os fatores tempo de reação, proporção AB:H<sub>2</sub>O e a amplitude das ondas de ultrassom influenciam no sistema. Por esta análise, verificou-se que o maior tempo de reação, a maior razão AB:H<sub>2</sub>O e menor amplitude das ondas de ultrassom, não resultou na formação de microesferas com geometria esférica bem definidas. No entanto, na imagem da Figura 3.5.b, relativa a formulação  $\mu P_5$  (Tabela 3.2), observou-se a formação de algumas micropartículas esféricas.

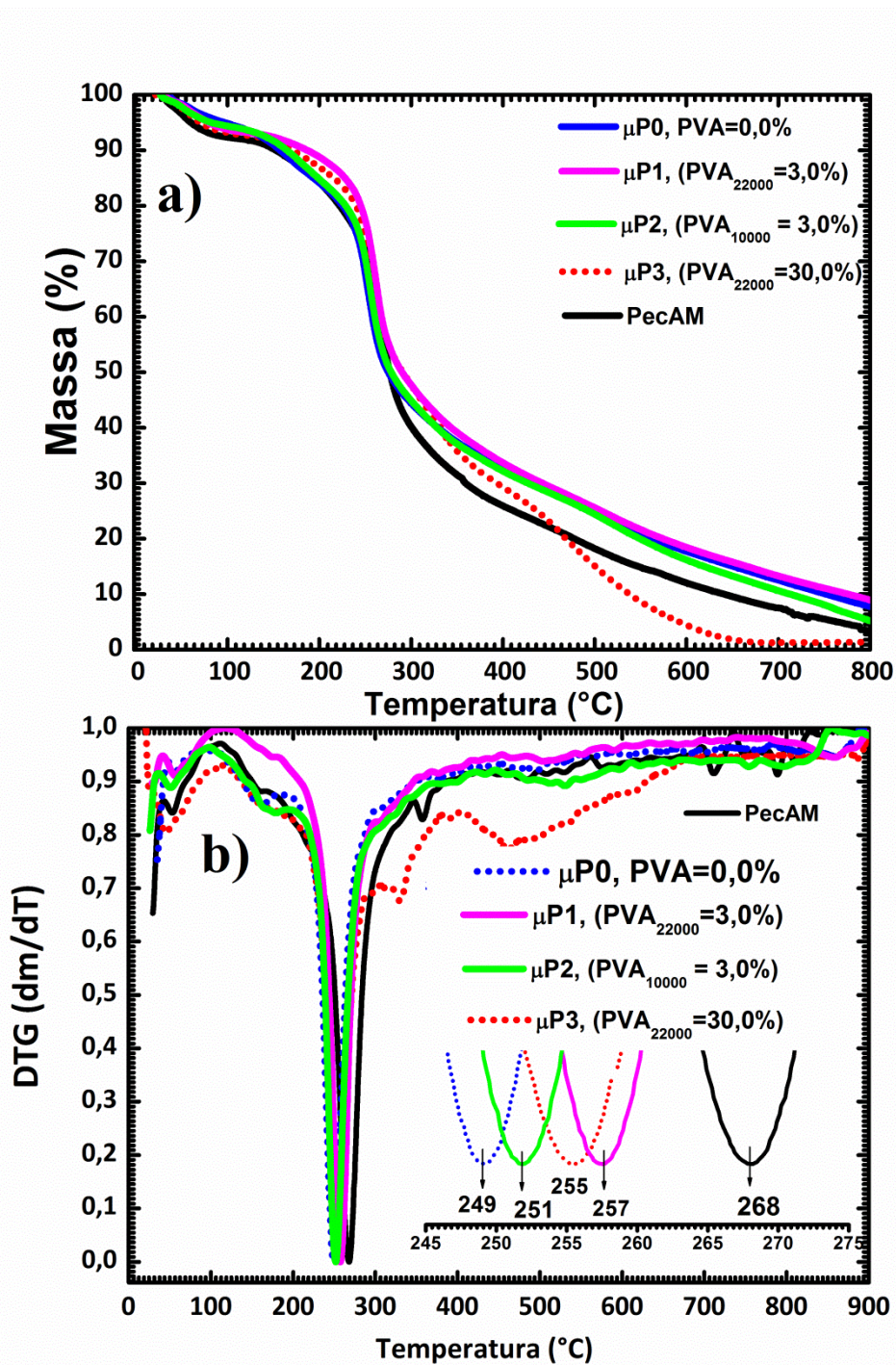


**Figura 3. 5.** Imagens obtidas por MEV de: (a)  $\mu\text{P4}$ , tempo = 35 min; (b)  $\mu\text{P5}$ , AB:H<sub>2</sub>O = 4:1; (c)  $\mu\text{P6}$ , Amplitude = 80,0 %.

A estabilidade da emulsão é determinada por diversos fatores, entre eles o tempo de agitação, o equilíbrio entre as fases e a intensidade de aceleração, determinada pela amplitude. A intensidade da aceleração é um dos fatores mais importantes que influenciam na transformação eficiente de energia em cavitação. Quanto maior a intensidade, mais elevada é a diferença de pressão, a qual por sua vez aumenta a probabilidade de criação de bolhas. Assim, quanto maior a intensidade, maior é a fração da energia que é transformada em cavitação. E, como no caso deste trabalho, em que se usa um transdutor de ultrassom, a intensidade da aceleração é descrita pela amplitude de oscilação. Desta forma, amplitudes superiores resultam na formação mais eficaz de cavitação (*Hielscher 2013*). Desta forma, fica evidente que as condições: tempo de reação de 20 min., AB/H<sub>2</sub>O = 3/1 e amplitude das ondas de ultrassom 100% são adequadas para obter micropartículas esféricas na emulsão PecAM/AB estabilizadas pelo PVA22 (na concentração de 3,0% m/m).



As curvas de TG/DTG das microesferas obtidas ( $\mu\text{P0}$ ,  $\mu\text{P1}$ ,  $\mu\text{P2}$  e  $\mu\text{P3}$ ) e de PecAM são apresentadas na Figura 3.6. As estabilidades térmicas das microesferas de PecAM foram comparadas à estabilidade da PecAM não particulada. Na região de 25 a 125 °C, a perda de massa é referente à volatilização da água adsorvida nas amostras. Constatou-se que as microesferas  $\mu\text{P0}$ ,  $\mu\text{P1}$ ,  $\mu\text{P2}$  e  $\mu\text{P3}$  apresentaram conteúdos de água levemente menores quando comparadas à PecAM. O conteúdo de água nas microesferas variou de 6-4 %, enquanto a PecAM apresentou conteúdo de água de aproximadamente 7,0%. Entre as microesferas, a formulação  $\mu\text{P0}$  apresentou menor porcentagem de água, aproximadamente 4,0%. Com a adição do PVA, a porcentagem de água nas microesferas obtidas na formulação  $\mu\text{P1}$  e  $\mu\text{P2}$  foi de aproximadamente 5% e, por fim, as microesferas  $\mu\text{P3}$  apresentaram teor de água de aproximadamente 6,0%.



**Figura 3. 6. a)** Curvas de TG e **b)** a primeira derivada (DTG), para as microesferas  $\mu\text{P0}$ ,  $\mu\text{P1}$ ,  $\mu\text{P2}$ ,  $\mu\text{P3}$  e PecAM.

A menor porcentagem de água nas microesferas  $\mu\text{P0}$  revela que estas apresentam diferente hidrofiliicidade em relação a PecAM. As microesferas  $\mu\text{P0}$ , obtidas sem a adição de PVA, são

formadas devido à organização das cadeias da PecAM, formando micelas, ou seja, os grupos hidrofílicos da PecAM se organizam na parte interna e os grupos hidrofóbicos na superfície das micelas, o que explica o maior caráter hidrofóbico das microesferas  $\mu\text{P0}$  em relação à PecAM não microparticulada.

Com a adição do PVA nas formulações, as microesferas obtidas contêm PVA adsorvido e apresentam maior hidrofiliidade se comparadas com as micropartículas  $\mu\text{P0}$ . Ainda, quanto maior a concentração de PVA utilizada na formulação, maior é a porcentagem de água adsorvida na superfície das micropartículas. Este fato se deve ao caráter hidrofílico do PVA.

O outro evento presente nas curvas de TG é referente à degradação dos polímeros e ocorre entre 250-270 °C como pode ser visualizado na Figura 3.6.b. As microesferas apresentaram temperatura de degradação menor do que a PecAM não microparticulada. Porém, ficou comprovada a melhora da estabilidade térmica das microesferas estabilizadas com PVA, pois as partículas  $\mu\text{P1}$ ,  $\mu\text{P2}$  e  $\mu\text{P3}$  apresentaram temperaturas de degradação maiores que as partículas  $\mu\text{P0}$ . No entanto, observou-se que a adição de maior quantidade de PVA não apresenta vantagens para a estabilidade térmica do material. Por outro lado, o PVA22 contribuiu mais efetivamente para a estabilidade das microesferas que o PVA10. Diante dos dados até aqui discutidos, verifica-se que o uso do PVA22 com concentração de 3,0% relativo à massa de PecAM é bastante adequado para se obter micropartículas esféricas de menor tamanho médio, distribuição mais estreita de tamanho e com maior estabilidade térmica, portanto, micropartículas mais consistentes.

Os difratogramas (DRX) das microesferas e da PecAM são apresentados na Figura 3.7. O primeiro e importante aspecto a ser discutido na análise dos difratogramas da Figura 3.7 é a ausência do pico em  $2\theta = 31,6^\circ$  nos difratogramas das microesferas. Este pode ser outro indício de que este sinal está relacionado a ligações de hidrogênio na PecAM, já que o mesmo não aparece no perfil de DRX das microesferas que, possivelmente, se organizam de forma diferente em relação a PecAM

não microparticulada. Assim, a reorganização das cadeias de PecAM na emulsão AB/H<sub>2</sub>O pode não favorecer as interações de hidrogênio entre as cadeias de PecAM.

De modo geral, os perfis dos difratogramas de DRX das microesferas são semelhantes entre si. O sinal observado no difratograma da PecAM em  $2\theta = 21,5^\circ$  se desloca sutilmente nos difratogramas das microesferas para valores menores, seguido por um estreitamento do sinal. Este fato pode sugerir que as microesferas apresentam maior ordenamento. Além disso, pode-se observar o surgimento de um halo em  $2\theta = 14^\circ$  apenas na amostra  $\mu P1$ , podendo sugerir um melhor ordenamento das micropartículas obtidas nesta formulação.

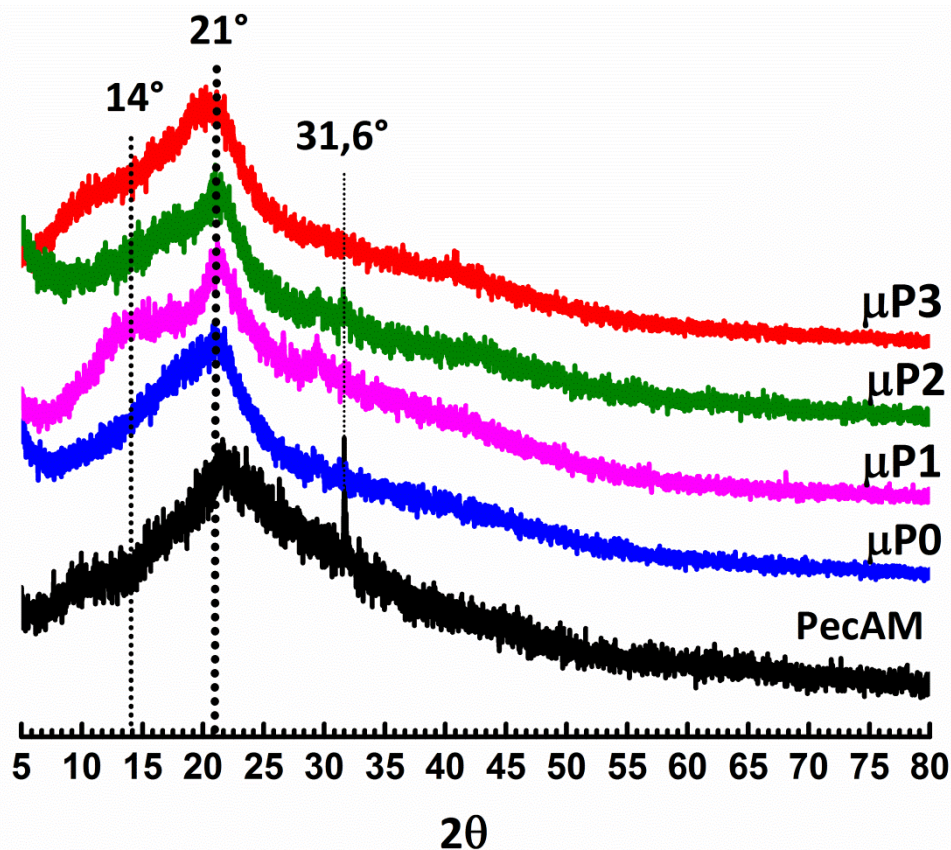
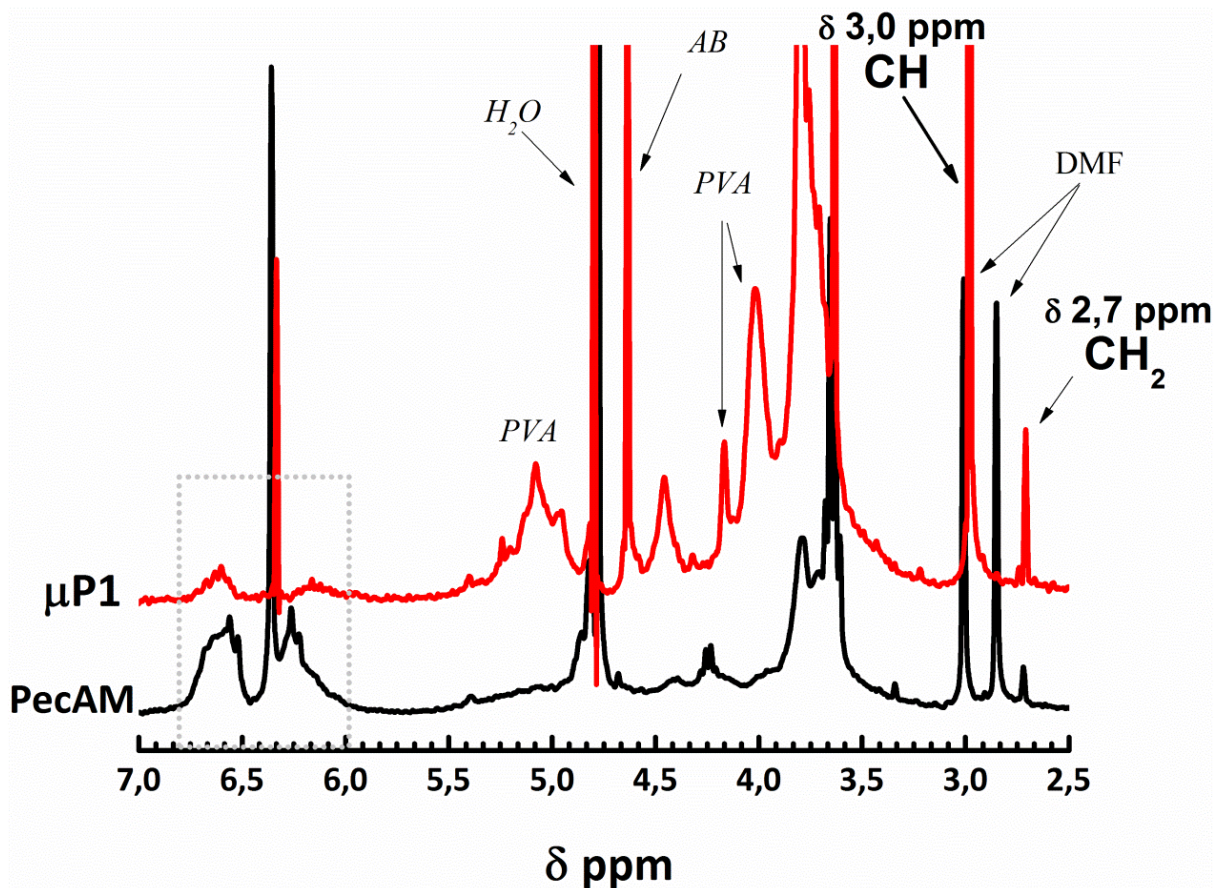


Figura 3. 7. Difratogramas  $\mu P0$ ,  $\mu P1$ ,  $\mu P2$ ,  $\mu P3$  e PecAM.

A reação de polimerização foi confirmada, por meio da análise de RMN <sup>1</sup>H dos espectros normalizados da PecAM e das micropartículas  $\mu P1$ , Figura 3.8. É possível observar claramente que os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos na região de  $\delta$  6-7 ppm que aparece no espectro RMN

$^1\text{H}$  da PecAM, praticamente desaparecem no espectro das microesferas  $\mu\text{P1}$ . Além disso, ocorre o aparecimento de sinais em  $\delta$  3,0 ppm, atribuídos a átomos de hidrogênio de ligações CH, e o sinal em  $\delta$  2,7 ppm referente a átomos de hidrogênio de ligações  $\text{CH}_2$ . Estes fatos tornam evidente o processo de polimerização/reticulação durante a obtenção das microesferas, formando microgéis.



**Figura 3. 8.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da PecAM e de micropartículas  $\mu\text{P1}$ .

O potencial zeta das microesferas  $\mu\text{P1}$  foi medido, sendo obtido o valor  $-16,04 \pm 0,4$  mV. O potencial zeta revela que o processo de obtenção das microesferas contribui para diminuir a densidade de cargas negativas na superfície com relação a PecAM ( $-22,8 \pm 1,3$  mV, Capítulo 2). Tal fato pode ser atribuído ao uso do PVA que como atua estabilizante e minimiza a densidade de cargas negativas no sistema.

### 3.6. CONCLUSÕES

Foram obtidas micropartículas de PecAM, pelo método de emulsão inversa, induzida por ultrassom, utilizando PVA (de duas massas molares e concentrações de 0, 3,0 e 30% m/m) como estabilizante da emulsão. A morfologia das micropartículas foi caracterizada por imagens de MEV. Verificou-se que as partículas possuem geometria esférica. Pela análise das imagens de MEV (a partir das quais se obteve o tamanho médio das microesferas e a respectiva distribuição de tamanho, para cada condição estudada) foi possível verificar que o PVA22 na concentração de 3,0% m/m conduz a menor tamanho médio e distribuição mais estreita de tamanhos. Além disso, foi observado que maior tempo de reação (35 min), maior proporção de AB:H<sub>2</sub>O e menor amplitude de ondas de ultrassom, ou seja menor intensidade, não são favoráveis para obtenção de microesferas. De acordo com as análises de distribuição de tamanhos, as microesferas apresentaram tamanhos entre 20-36  $\mu\text{m}$ , com valor médio de  $20 \pm 5 \mu\text{m}$ .

As análises das curvas de TG/DTG mostraram que as microesferas apresentam menor estabilidade térmica quando comparada a PecAM, porém mostrou que a adição de PVA contribui para maior estabilidade térmica das micropartículas. Além disso, os difratogramas de DRX demonstram alteração na organização estrutural das micropartículas, especificamente nas obtidas usando a formulação  $\mu\text{P1}$ , cujo perfil de DRX apresentou um halo na região de  $2\theta = 14^\circ$ .

O processo de polimerização foi confirmado por análise de RMN <sup>1</sup>H, no qual foi possível observar no espectro das micropartículas o desaparecimento dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio vinílicos presentes no espectro RMN <sup>1</sup>H da PecAM original, região  $\delta$  6-7 ppm. Também ocorreu o aparecimento de sinais atribuídos a átomos de hidrogênio referentes à ligações CH e CH<sub>2</sub>, em  $\delta$  3,0 e  $\delta$  2,7, respectivamente, no espectro RMN <sup>1</sup>H das micropartículas.

## CAPÍTULO IV

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PecAM  
COM PROPRIEDADES TERMOSENSÍVEL E MAGNÉTICAS.****4.1. INTRODUÇÃO****4.1.1. Hidrogéis inteligentes**

Hidrogéis inteligentes têm sido usados em diversas aplicações, como a fabricação de músculos artificiais, válvulas químicas, imobilização de enzimas e de células, entre outras. Essa classe de materiais pode ser concebida para exibir variações significativas de volume em resposta a pequenas mudanças no ambiente no qual está inserido, tais como pH, força iônica, temperatura, campo elétrico, luz, pressão, solvente, ou campo magnético (*Sahiner, Godbey et al. 2006*). Portanto, os hidrogéis com estas características são candidatos ideais para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (*Qiu and Park 2012*).

A seguir são descritos alguns comportamentos de hidrogéis sensíveis à temperatura e ao campo magnético, que são algumas das propriedades intrínsecas dos materiais desenvolvidos nesta Dissertação.

**4.1.1.1. Hidrogéis sensíveis à temperatura**

A resposta à variação de temperatura é o sinal mais amplamente utilizado para uma ampla variedade de sistemas de administração de fármacos. O uso da temperatura como estímulo é justificado pelo fato de a temperatura do corpo frequentemente afastar-se do valor fisiológico (ca. de 37 °C) quando há a presença de patógenos ou pirogênicos. Este desvio pode ser um estímulo útil para ativar a liberação de agentes terapêuticos a partir de carreadores inteligentes de fármacos, termossensíveis, no caso para combater doenças acompanhadas por febre.

Os veículos de entrega de fármacos sensíveis à temperatura utilizam várias propriedades dos polímeros, incluindo a transição térmica reversível, intumescimento das redes, transição vítrea e fusão cristalina (Bajpai, Shukla et al. 2008).

A resposta à variação da temperatura pode ser positiva ou negativa. Os polímeros com dependência positiva da temperatura aumentam seu volume com o aumento da temperatura, enquanto os que apresentam dependência negativa diminuem o seu volume com o aumento da temperatura. Os polímeros com dependência negativa da temperatura são solúveis em água a temperaturas abaixo da região da transição (LCST) devido ao seu caráter hidrofílico, mas colapsam a temperaturas acima da região de transição, devido à prevalência de interações polímero-polímero em detrimento de interações polímero-solvente, resultando na separação de fases da solução.

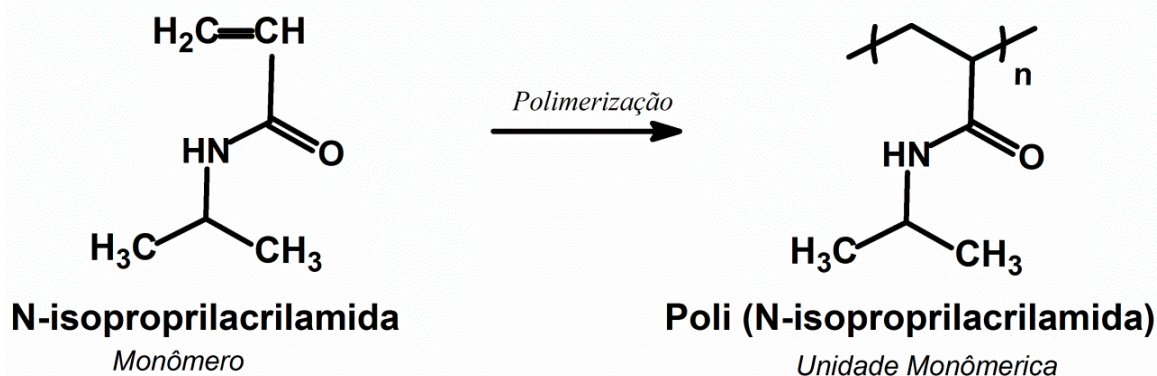
Em oposição ao comportamento LCST, alguns polímeros termossensíveis possuem temperatura crítica de solução superior (UCST, “Upper Critical Solution Temperature”). Hidrogéis baseados em polímeros que apresentam diagrama de fases do tipo UCST para um determinado solvente tendem a colapsar (ou contrair-se) a temperaturas inferiores à UCST e expandir (intumescer) quando acima da UCST devido à afinidade com o solvente nesta condição (Medeiros, Santos et al. 2011).

Os hidrogéis termossensíveis são normalmente constituídos de polímeros que apresentam diagramas de fase tipo LCST. Os polímeros com esta característica possuem grupos moderadamente hidrofóbicos, ou possuem mistura de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos (Deligkaris, Tadele et al. 2010).

Dentre os polímeros termossensíveis mais amplamente utilizados nas aplicações biomédicas, está o poli(N-isopropil acrilamida), mais conhecido como PNIPAAm (Zhang, Wu et al. 2004), (de Moura, Aouada et al. 2006), (Wei, Cheng et al. 2009), (Leal, De Borggraeve et al. 2013). O PNIPAAm é obtido a partir da polimerização de monômeros N-isopropil acrilamida (NIPAAm),



Figura 4.1. Existem várias metodologias para se obter o PNIPAAm (Francisco H. A. R et al 2013), entre eles os que usam o sistema persulfato/TEMED são os mais utilizados.



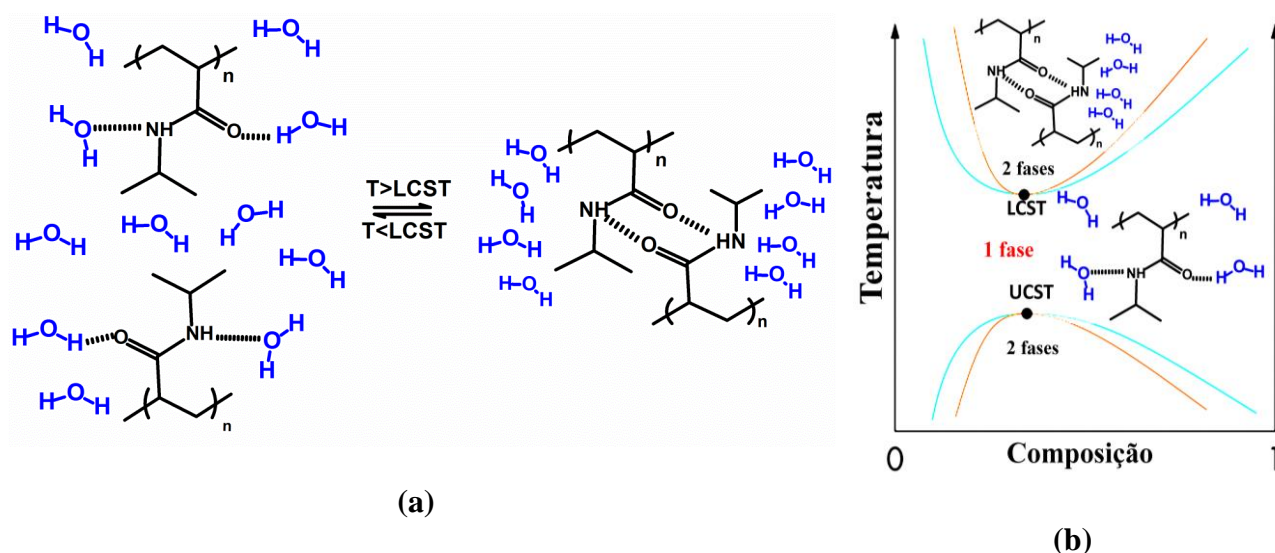
**Figura 4. 2.** Estrutura química de monômeros N-isopropil acrilamida (NIPAAm) e da poli (N-isopropil acrilamida) (PNIPAAm).

O PNIPAAm possui LCST em torno de 31-33 °C, sendo comumente referido como um material inteligente (Schild 1992). A transição de fases (LCST) do PNIPAAm em água está esquematicamente ilustrada na Figura 4.2.

O termo "inteligente" se deve à mudança de comportamento do PNIPAAm em solução aquosa quando se atinge a LCST. Quando a temperatura está abaixo da LCST, a água atua como um bom solvente para as cadeias do PNIPAAm, que formam ligações de hidrogênio com os grupos amida. No entanto, na LCST ou acima dela tais interações são desestabilizadas e interações polímero-polímero tornam-se dominantes, resultando na expulsão da água de solvatação (Medeiros, Santos et al. 2011). Então, um hidrogel a base de PNIPAAm que esteja intumescido abaixo da LCST contrai-se quando atinge a LCST. Tal fenômeno tem encontrado variadas aplicações tecnológicas e biotecnológicas (Motornov, Roiter et al. 2010).

Por exemplo, a presença de grupos funcionais nas cadeias do polímero obtido por copolimerizar o NIPAAm com monômeros mais hidrofílicos pode contribuir para ajustar a LCST dos materiais para valores desejados (Rzaev, Dincer et al. 2007), (Lin and Cheng 2001). Vários estudos têm sido realizados considerando-se a copolimerização de NIPAAm com outros

comonômeros mais ou menos hidrofílicos, tais como poli(N-isopropil acrilamida-co-2-hidroxi-isopropil acrilamida) e poli(N-isopropil acrilamida-co-N-vinil pirrolidona), por exemplo. Estes copolímeros possuem valores de LCST, em água, maiores do que PNIPAAm (Medeiros, Santos et al. 2011).



**Figura 4.3.** a) Mudança de comportamento (hidrofílica/hidrofóbica) do PNIPAAm frente à água, LCST; b) Diagrama de Fases LCST e UCST, destacando o comportamento LCST do PNIPAAm.

#### 4.1.1.2. Hidrogéis sensíveis ao campo magnético

Hidrogéis que possuem partículas magnéticas incorporadas na matriz 3D são sensíveis ao campo magnético e são frequentemente denominados como ferrogéis (Zrinyi, Barsi et al. 1996). Ao incorporar nanopartículas sólidas em um hidrogel, são produzidos sistemas híbridos (nanocompósitos) com o objetivo de combinar as propriedades das nanopartículas com as propriedades do hidrogel.

As propriedades dos hidrogéis compósitos, magnéticos, são influenciadas pela presença de um campo magnético externo. Estes sistemas se destacam como materiais para um amplo campo de aplicações, desde a medicina até a engenharia mecânica, devido a sua versatilidade (Alveroğlu, Sözeri et al. 2013).

O magnetismo tem uma profunda influência sobre os organismos vivos. Por exemplo, a hemoglobina (uma proteína que contém ferro) presente no sangue é magnética. Há evidências de que todos os seres vivos, incluindo os seres humanos, contêm partículas magnéticas que atuam como receptores magnéticos. Desta forma, é um fato estabelecido que o magnetismo e materiais magnéticos têm um papel importante a desempenhar na área da saúde e em aplicações biológicas (*Bajpai, Shukla et al. 2008*).

A combinação de partículas com dimensões nas escalas nano e submicrométrica e magnetismo possibilita que áreas da biologia e de biomateriais proponham aplicações biomédicas úteis e sofisticadas, tais como a separação de células/gene, liberação de fármacos, hipertermia e tratamento magnético de câncer intracelular (*Bajpai, Shukla et al. 2008*).

O direcionamento magnético de dispositivos de liberação de fármacos é uma solução alternativa para as limitações apresentadas pelos sistemas convencionais de administração de fármacos. Entre as desvantagens das formas de administração convencionais podem ser citadas a distribuição geral, a inespecificidade em direção a um local patológico, a necessidade de altas doses para atingir a concentração local suficiente (*Mahmoudi, Sant et al. 2011*).

A resposta magnética é obtida, por exemplo, pelo uso de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs). Esses materiais podem ser direcionados para a área desejada através ímãs externos e, devido ao seu comportamento superparamagnético, essas partículas não apresentam interação magnética quando o campo magnético externo é removido.

Dentre os materiais magnéticos de maior interesse estão a magnetita e a maghemita. Elas são as mais empregadas em aplicações biomédicas, uma vez que a sua biocompatibilidade já foi comprovada (*Mahmoudi, Sant et al. 2011*).

A Magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , é um óxido de ferro magnético comum que tem uma estrutura espinélio inversa, constituída por 32 íons de  $\text{O}^{2-}$  regularmente organizados formando uma célula unitária

cúbica compacta de face centrada, 8 sítios tetraédricos ocupados por  $\text{Fe}^{3+}$  e 16 sítios octaédricos ocupados por íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (SCHETTINO 2009).

Estudos provaram, experimentalmente, a alta eficiência de um material superparamagnético em suspensão para absorver a energia de um campo magnético alternado e convertê-la em calor. Considerando que células doentes são mais sensíveis a um aumento de temperatura do que as saudáveis (Jordan, Scholz et al. 1999), esta propriedade pode ser utilizada *in vivo* para aumentar a temperatura do tecido no qual se localiza o tumor e destruir as células patológicas por hipertermia. Esta técnica é promissora para tratamento de câncer porque possui facilidade em atingir o tecido canceroso e, portanto, apresenta menos efeitos colaterais do que a quimioterapia e radioterapia (Laurent, Dutz et al. 2011).

### ***Definição de Hipertermia***

A hipertermia (HT, terapia térmica, termoterapia) é definida como o fenômeno natural ou artificial que envolve o aumento da temperatura do corpo ou de uma região particular do corpo ou de outro organismo vivo a patamares capazes de comprometer, ou mesmo de colapsar, seus metabolismos. Na área de oncologia a HT é considerada como sendo uma forma de aumentar artificialmente a temperatura do tecido corporal, por meio do calor gerado a partir de fontes externas, para destruir células cancerosas ou impedir a sua crescimento (Chichel, Skowronek et al. 2007).

### ***Sistemas multi-responsivos e suas aplicações biológicas***

Os sistemas multi-responsivos podem alterar seu comportamento em resposta a diferentes estímulos, como é o caso dos sistemas inteligentes que consistem de um núcleo magnético para a produção de calor e uma casca polimérica sensível a outros estímulos, tais como pH e temperatura. Nestes sistemas, o fármaco é carregado no dispositivo o qual protege e permite a sua liberação no

destino desejado, onde a temperatura de núcleo magnético é aumentada, por exemplo, por uma alternância de um campo magnético externo, resultando em alterações estruturais/conformacionais da casca polimérica. Essas alterações levam a liberação do fármaco especificamente na célula cancerosa (Laurent, Dutz et al. 2011).

A principal aplicação destes sistemas é a liberação específica de fármacos, uma vez que os mesmos podem diminuir os efeitos colaterais devido a sua especificidade e controle da dosagem por meio de estímulos externos.

## 4.2. OBJETIVOS

- Sintetizar micropartículas esféricas magnéticas e termossensíveis à base de PecAM, contendo PNIPAAm e magnetita, por meio de sistema de emulsão água/álcool benzílico.
- Caracterizar as micropartículas por meio de diferentes técnicas, a fim de avaliar as melhores condições de obtenção de sistemas com propriedades apropriadas para o uso como dispositivos de liberação controlada de fármacos.

## 4.3. EXPERIMENTAL

### 4.3.1. Materiais

Magnetita (F, óxido de ferro II, III; tamanho das partículas < 50 nm) foi adquirida da Sigma-Aldrich (Alemanha). N-isopropil acrilamida, 99% (NIPAAm), adquirida da Across Organics (Alemanha). Os demais materiais utilizados, Persulfato de sódio (PS), Polivinil álcool (PVA22, 88% hidrolisado, MM média 22.000 g/mol), Álcool benzílico (AB), acetona, N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) e PecAM são os mesmos já descritos nos Capítulos 2 e 3 desta Dissertação.

## 4.3.2. Procedimentos

### 4.3.2.1. Síntese da PNIPAAm

Foram solubilizados 5,0 g de NIPAAm e 0,4 g de persulfato de sódio (PS) em 100 mL de água. Gás nitrogênio foi borbulhado na solução durante 30 min. Em seguida, foi adicionado 0,7 mL de TEMED ( $0,57 \text{ mol L}^{-1}$ ). O sistema foi mantido sob agitação por 24 h e finalmente o PNIPAAm foi precipitado por gotejar a solução do polímero, a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), em água a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 4.3.2.2. Microesferas de PecAM-co-PNIPAAm-Magnetita ( $\mu\text{PPM}$ )

Para cada síntese, a fase aquosa foi preparada igualmente ao procedimento de síntese de microesferas de PecAM (Capítulo 3, seção 3.3.2.1), a partir da adição dos polímeros (PecAM e PVA22, 3,0% m/m em relação a massa de PecAM) em água destilada sob agitação, a  $50^\circ \text{C}$ . Em seguida, a fase aquosa, totalmente solúvel e resfriada, foi adicionada gota a gota à fase AB, já contendo a magnetita, sob atmosfera de  $\text{N}_{2(\text{g})}$  e sonicação. O monômero NIPAAm foi adicionado após a obtenção de emulsão (aproximadamente 5 min) seguido da adição do PS (1,5% m/m) e do TEMED (1,0% m/m). Após a adição de todos os reagentes, o sistema foi mantido sob sonicação (amplitude das ondas de ultrassom 100%) e atmosfera de  $\text{N}_{2(\text{g})}$  por mais 15 min, totalizando 20 min para o tempo de reação. As condições utilizadas para cada formulação estão descritas na Tabela 4.1.

**Tabela 4. 1.** Condições empregadas nas sínteses das microesferas  $\mu$ PPM.

Amostras	PecAM (%-m/v)	NIPAAm (%-m/m)	Magnetita (%-m/m)
$\mu$ PPM-1	2,5	2,0	1,0
$\mu$ PPM-2	1,25	2,0	1,0
$\mu$ PPM-3	2,5	2,0	10,0
$\mu$ PPM-4	2,5	10,0	1,0
$\mu$ PPM-5	2,5	10,0	10,0
$\mu$ PPM-6	2,5	6,0	5,5
$\mu$ PPM-6b(**)	2,5	6,0	5,5
$\mu$ PPM-1b(*)	2,5	2,0	1,0

(\*)  $\mu$ PPM-6b foi usado o PVA22.

(\*\*)  $\mu$ PPM-1b, foi realizada na ausência de banho de gelo.

#### 4.3.2.2. Experimentos complementares ao estudo da formação de microesferas de PecAM.

Para a melhor compreensão do sistema PecAM, PVA, NIPAAm (ou PNIPAAm) e Magnetita, alguns experimentos complementares foram realizados. Seguindo basicamente o procedimento descrito na seção anterior, foram sintetizadas amostras compostas de PecAM e PNIPAAm, visando observar a influência do NIPAAm (ou do PNIPAAm ao invés do NIPAAm) na formação de microesferas. Nestas sínteses foi avaliado como a copolimerização partindo do monômero NIPAAm ou do polímero PNIPAAm, afeta as propriedades das micropartículas obtidas na ausência ou presença de PVA. Além disso, foi avaliada a formação de microesferas por meio de emulsão água/álcool benzílico utilizando apenas PecAM e Magnetita na formulação. Finalmente, avaliou-se como a adição direta do polímero, PNIPAAm, influenciou nas sínteses de partículas de PecAM-co-PNIPAAm-Magnetita.

Em todas as sínteses foi usada a proporção de AB:H<sub>2</sub>O = 3:1, sonicação (amplitude das ondas de ultrassom em 100%), concentração (m/m) de PS e de TEMED, respectivamente, de 1,5% e

1,0% em relação a massa de PecAM, reação em banho de gelo e tempo total de reação igual a 20 min. As demais condições utilizadas nos experimentos complementares estão descritas na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Condições empregadas para os experimentos complementares descritos na seção 4.3.2.2.

	<b>PecAM</b> (% /v)	<b>PVA22</b> (%m/m)	<b>NIPAAm</b> (%m/m)	<b>PNIPAAm</b> (%m/m)	<b>Magnetita</b> (%m/m)
<b>μPP-1</b>	2,5	3,0	2,0	0,0	0,0
<b>μPP-1b</b>	2,5	0,0	6,0	0,0	0,0
<b>μPP-1c</b>	2,5	3,0	0,0	6,0	0,0
<b>μPM-1</b>	2,5	3,0	0,0	0,0	5,5
<b>μPM-1</b>	2,5	0,0	0,0	0,0	5,5
<b>μPPM-6c</b>	2,5	3,0	0,0	6,0	5,5

#### 4.3.2.3. *Purificação das microesferas*

Para a separação/purificação das microesferas de PecAM/PNIPAAm/Magnetita, utilizou-se o mesmo procedimento de purificação adotado para a separação/purificação das microesferas de PecAM, já descrito no Capítulo 3 (seção 3.3.2.3) desta Dissertação.



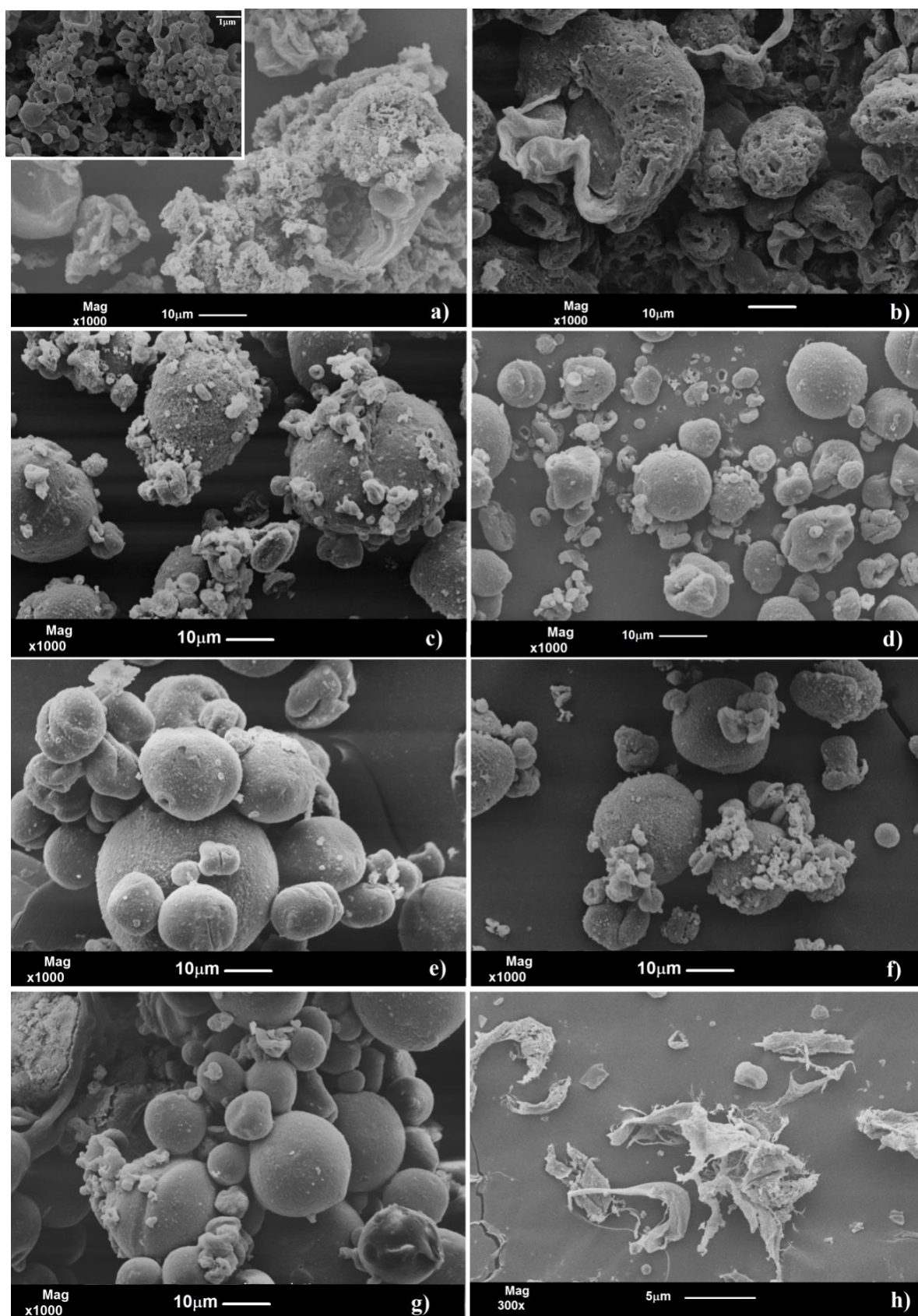
## 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.4.1. Microesferas de PecAM-co-PNIPAAm-Magnetita ( $\mu$ PPM)

As imagens de MEV apresentadas na Figura 4.3 indicam que na maioria das formulações obteve-se microesferas. Porém, não foi possível verificar total uniformidade nos tamanhos e na geometria das micropartículas obtidas. No entanto, observou-se que a diminuição da concentração da PecAM levou à desestabilização do sistema de emulsão. Por exemplo, não foi observada a formação de microesferas quando a concentração de PecAM foi 1,25% m/v, formulação  $\mu$ PPM-2, Figura 4.3.b. Na Tabela 4.3 são apresentados os valores médios de tamanho de partículas e o intervalo de distribuição de tamanho para cada formulação.

Ainda, de acordo com a imagem mostrada na Figura 4.3.a, na amostra obtida na formulação  $\mu$ PPM-1 ocorreu a formação de partículas com diâmetro médio em torno de 500 nm, mas aglomeradas formando *clusters* maiores, sem organização, sendo os *clusters* distribuídos heterogeneamente na amostra. Por outro lado, observou-se que o aumento da quantidade de magnetita ( $\mu$ PPM-3) ou de NIPAAm ( $\mu$ PPM-4) na formulação favoreceu a formação de microesferas com geometria esférica e melhor definida, Figura 4.3.c-d. O aumento da concentração de magnetita resultou em partículas de tamanhos maiores e com distribuição mais estreita de tamanhos, enquanto o aumento da concentração de NIPAAm resultou em partículas menores porém com maior intervalo de distribuição de tamanhos.

Concentrações intermediárias de ambos, NIPAAm e magnetita, como as usadas na formulação  $\mu$ PPM-6, resultou em partículas maiores, enquanto que concentrações maiores destes, formulação  $\mu$ PPM-5, bem como a adição direta do polímero PNIPAAm, formulação  $\mu$ PPM-6b, conduziu a microesferas com diâmetros menores. Não foram obtidas microesferas na ausência de banho de gelo ( $\mu$ PPM-1b).



**Figura 4. 4.** Imagens obtidas por MEV de: (a) μPPM-1; (b) μPPM-2; (c) μPPM-3; (d) μPPM-4; (e) μPPM-5; (f) μPPM-6; (g) μPPM-6b; (h) μPPM-1b.

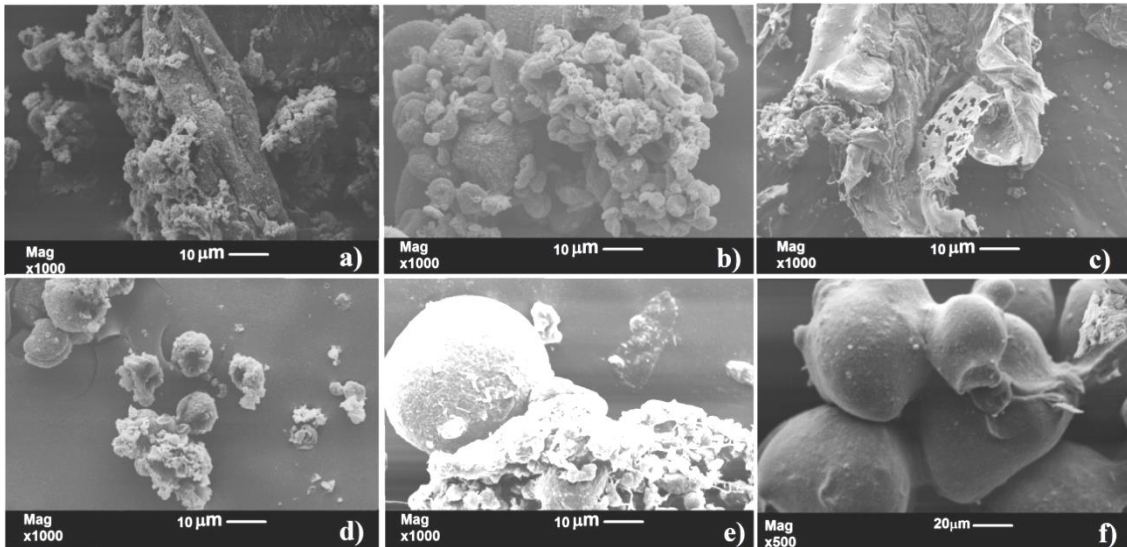
**Tabela 4. 3.** Tamanho médio e intervalo de distribuição de tamanho das microesferas de PecAM-PNIPAAm-Magnetita ( $\mu$ PPM). Tamanhos obtidos por meio das imagens de MEV (Fig 4.3).

	$\mu$ PPM-1	$\mu$ PPM-3	$\mu$ PPM-4	$\mu$ PPM-5	$\mu$ PPM-6	$\mu$ PPM-6b
Tamanho médio ( $\mu$ m)	0,52	26,3	10,1	20,0	24,7	23,9
Desvio Padrão ( $\mu$ m)	0,20	7,7	5,5	8,2	8,2	13,2

#### 4.4.2. Análise dos experimentos complementares

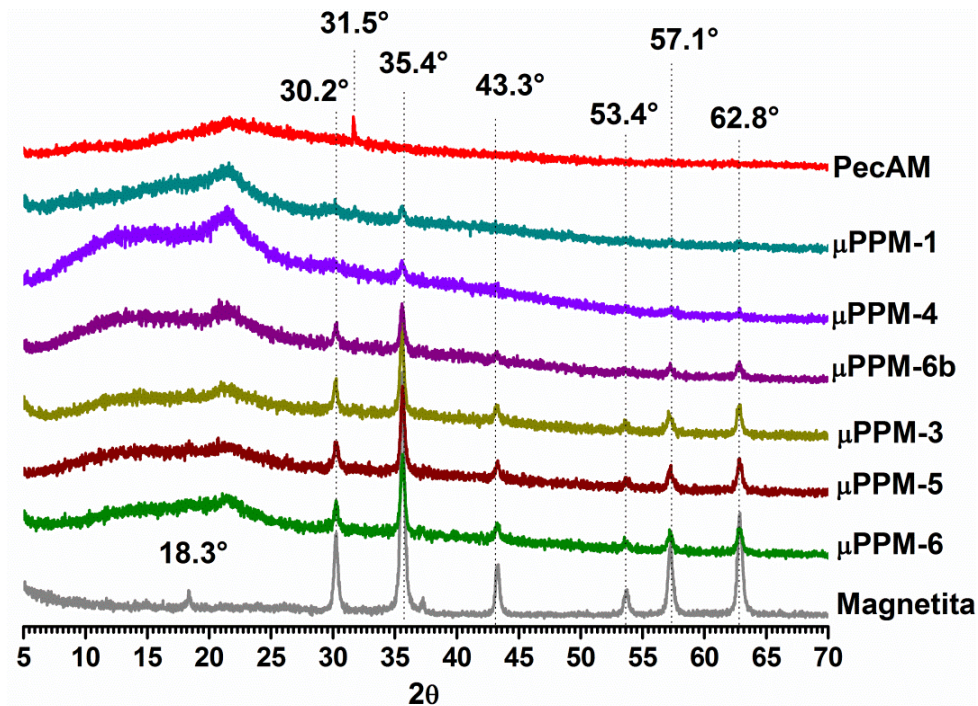
A partir das imagens obtidas por MEV foi possível observar que não foram obtidas microesferas quando se utilizou apenas PecAM e PNIPAAm, Figura 4.4.a. As Figuras 4.4 mostram que a condição mais adequada para obtenção de microesferas foi a que não se utilizou PVA (Fig. 4.4.b e 4.4.e), sugerindo que o PVA interfere negativamente na formação de microesferas. Por outro lado, a imagem de MEV das partículas obtidas na formulação em que se utilizou apenas PecAM e magnetita (sem uso de NIPAAm ou PNIPAAm e PVA), Figura 4.4.e, mostra que a magnetita favorece a formação de microesferas. Isto sugere que, possivelmente, interações entre PecAM e magnetita equilibram o caráter hidrofílico/hidrofóbico do sistema, favorecendo a formação de partículas esféricas, principalmente na ausência de PVA, micrografia Figura 4.4.b e 4.4.e.

Por último, avaliou-se como a adição direta de PNIPAAm no sistema influencia na morfologia das micropartículas. A imagem de MEV apresentada na Figura 4.4.f, relativa às partículas  $\mu$ PPM-6c, mostra que houve a formação de partículas com morfologia aproximadamente esféricas, mais do tipo gotas, e aglomeradas. Isto se apresenta como uma possibilidade para obtenção de microesferas do tipo  $\mu$ PPM, utilizando o polímero PNIPAAm como material de partida nas sínteses, ao invés do uso de NIPAAm, realizando ajustes de outras variáveis.



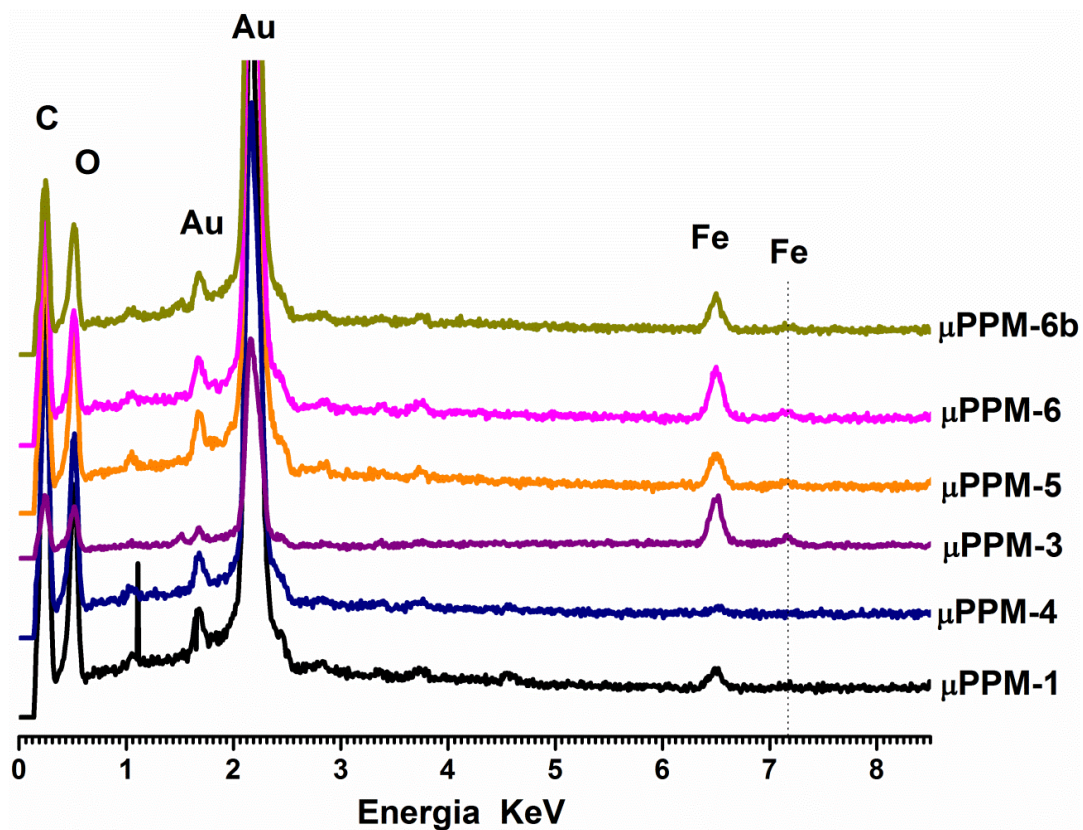
**Figura 4. 5.** Imagens de MEV, a)  $\mu$ PP-1, b)  $\mu$ PP-1b, c)  $\mu$ PP-1c, d)  $\mu$ PM-1, e)  $\mu$ PM-1b, f)  $\mu$ PPM-6c.

A presença de magnetita nas microesferas foi confirmada por análises de DRX e EDX, Figuras 4.5 e 4.6, respectivamente. É possível observar claramente no perfil de DRX das microesferas do tipo  $\mu$ PPM (que contém PecAM, PNIPAAm e magnetita) os sinais referentes aos planos cristalinos da magnetita, sendo que estes se intensificam nos difratogramas das amostras cujas formulações possuem maiores composições de magnetita.



**Figura 4. 6.** Difratogramas da magnetita, das partículas  $\mu$ PPM-1,  $\mu$ PPM-4,  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-5,  $\mu$ PPM-6,  $\mu$ PPM-6b e da PecAM.

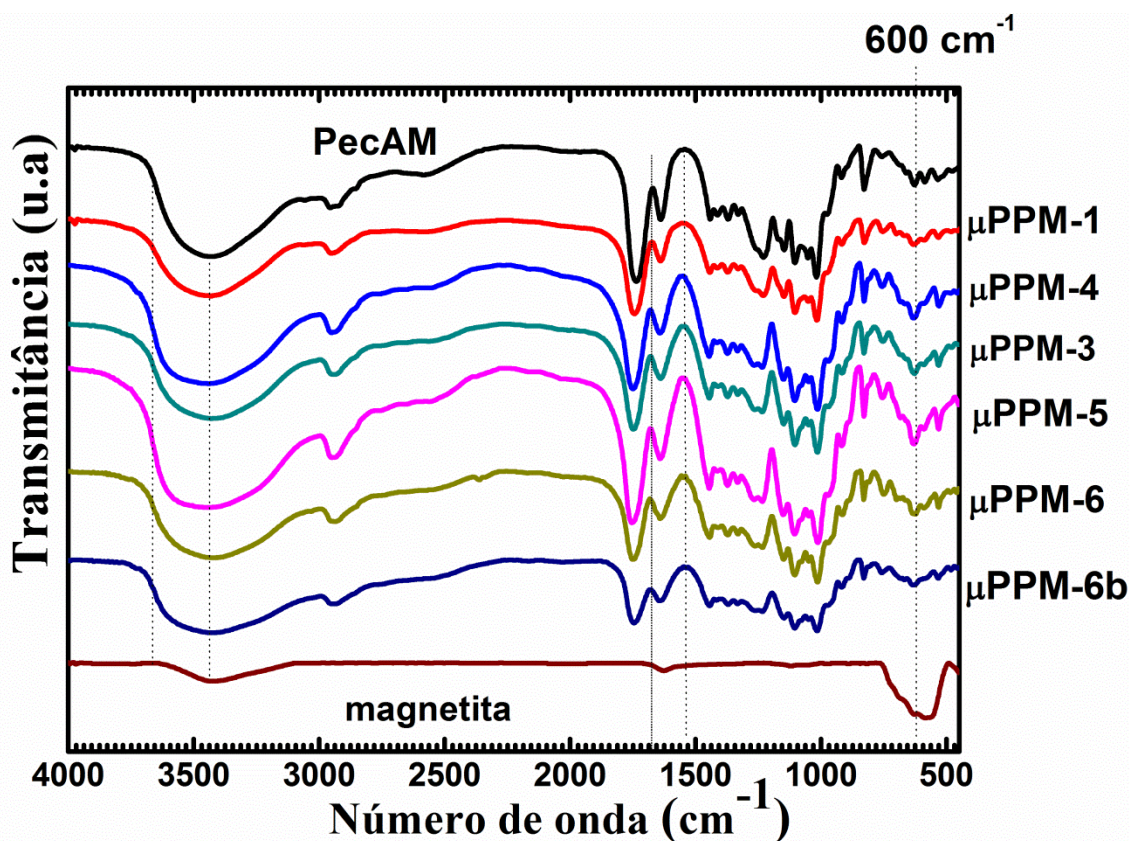
A presença de sinais característicos de átomos de ferro (Fe), devido a magnetita, foi detectada pelo aparecimento dos sinais característicos dos átomos de Fe em 6,4 KeV, que ocorreu como um sinal mais intenso em todas as amostras e em 7,1 KeV como um sinal menos intenso, observado apenas nas formulações  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-5,  $\mu$ PPM-6 e  $\mu$ PPM-6b, Figura 4.6. O aparecimento destes sinais depende da quantidade de magnetita presente na amostra em análise e, por isso, o sinal aparece menos acentuado em algumas amostras.



**Figura 4.7.** Espectros de EDX das micropartículas tipo  $\mu$ PPM (que contém PecAM, PNIPAAm e magnetita) obtidas em emulsão água/álcool benzílico.

Na Figura 4.7 são apresentados os espectros FTIR das partículas  $\mu$ PPM-1,  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4,  $\mu$ PPM-5,  $\mu$ PPM-6,  $\mu$ PPM-6b, da magnetita e da PecAM. Ocorreram alterações discretas em relação ao espectro FTIR da PecAM. Por exemplo, há o alargamento da banda de -OH na região  $3750 - 3060 \text{ cm}^{-1}$ , o que pode sugerir possíveis interações desses grupamentos com a magnetita.

O sutil alargamento da banda na região de  $1683 - 1552 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído às vibrações dos grupamentos C=O de amidas primárias e vibrações e das ligações N-H de amidas secundárias, oriundos do PNIPAAm (Jaiswal, Banerjee et al. 2010), (Leal, De Borggraeve et al. 2013). O sinal referente às vibrações das ligações N-H de amins secundárias, em  $3300 \text{ cm}^{-1}$ , não foi observado nos espectros FTIR das microesferas, pois esse sinal aparece na mesma região referente a vibrações das ligações OH. O aparecimento de uma banda discreta próxima a  $600 \text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a ligações do tipo Fe-O.



**Figura 4. 8.** Espectros FTIR das microesferas  $\mu$ PPM-1, da  $\mu$ PPM-3, da  $\mu$ PPM-4, da  $\mu$ PPM-5, da  $\mu$ PPM-6, da  $\mu$ PPM-6b.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , Figura 4.8, foram usados para confirmar a presença de grupamentos oriundos do PNIPAAm. Para tal, necessitou-se obter espectros de RMN  $^1\text{H}$  de amostras livres da magnetita, que interfere no campo magnético do equipamento. Desta forma, foi usada uma amostra preparada em uma formulação contendo o PNIPAAm e sem PVA ( $\mu$ PP-1b), pois

sinais de grupos  $\text{CH}_2$  do PVA poderiam interferir na visualização dos sinais referentes aos grupamentos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  do PNIPAAm.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  das partículas obtidas da formulação  $\mu\text{PP-1b}$  revelou o aparecimento de sinais na região entre  $\delta$  1,55 -  $\delta$  1,20 ppm. O aparecimento destes sinais foi atribuído à presença de grupos metileno e grupos metil terminais, na cadeia de PecAM, oriundos da estrutura do PNIPAAm (Leal, De Borggraeve et al. 2013). Como verificado na caracterização das microesferas de PecAM ( $\mu\text{P}$ ), o sinal referente aos átomos de hidrogênio vinílicos, em  $\delta$  6,0 -  $\delta$  6,7 ppm, desapareceu ou diminuiu, enquanto ocorreu o aparecimento de sinais em  $\delta$  3,00 ppm e  $\delta$  2,70 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio de ligações  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_2$ , respectivamente, referentes ao processo de polimerização da cadeia de PecAM ou seja, reticulação (Pavia 2010).

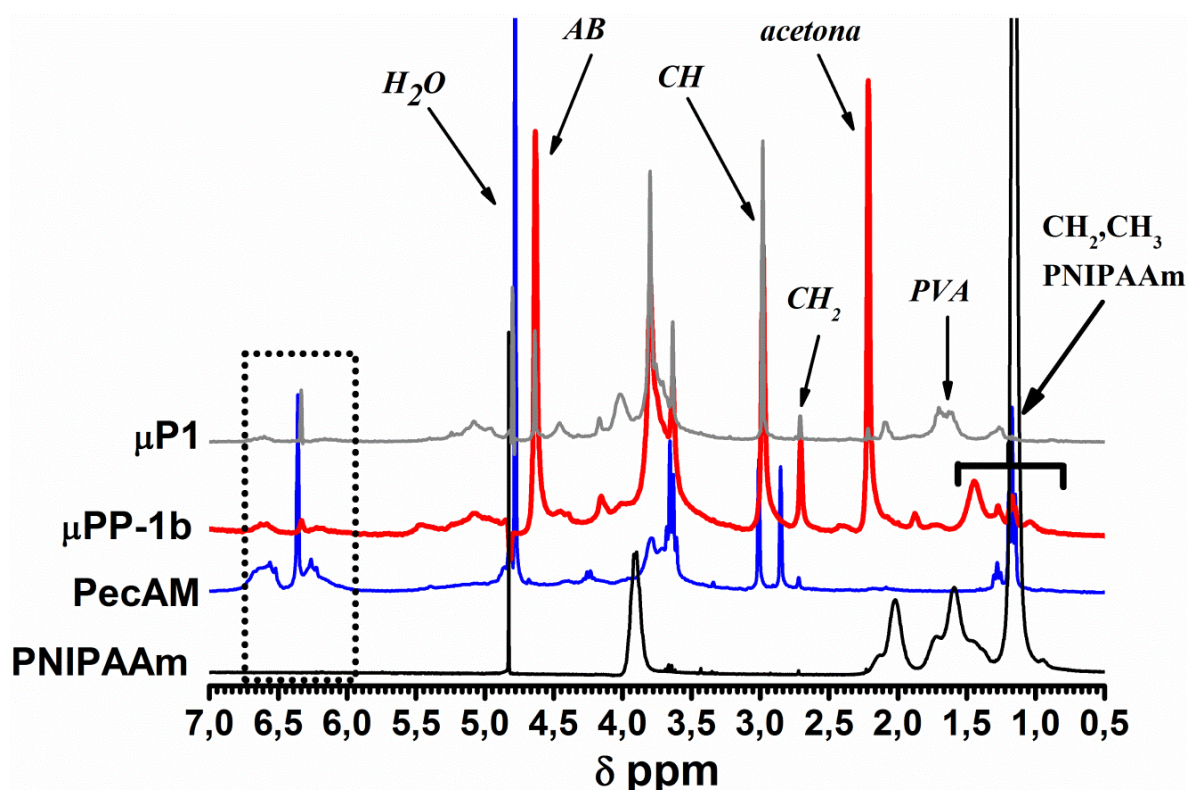


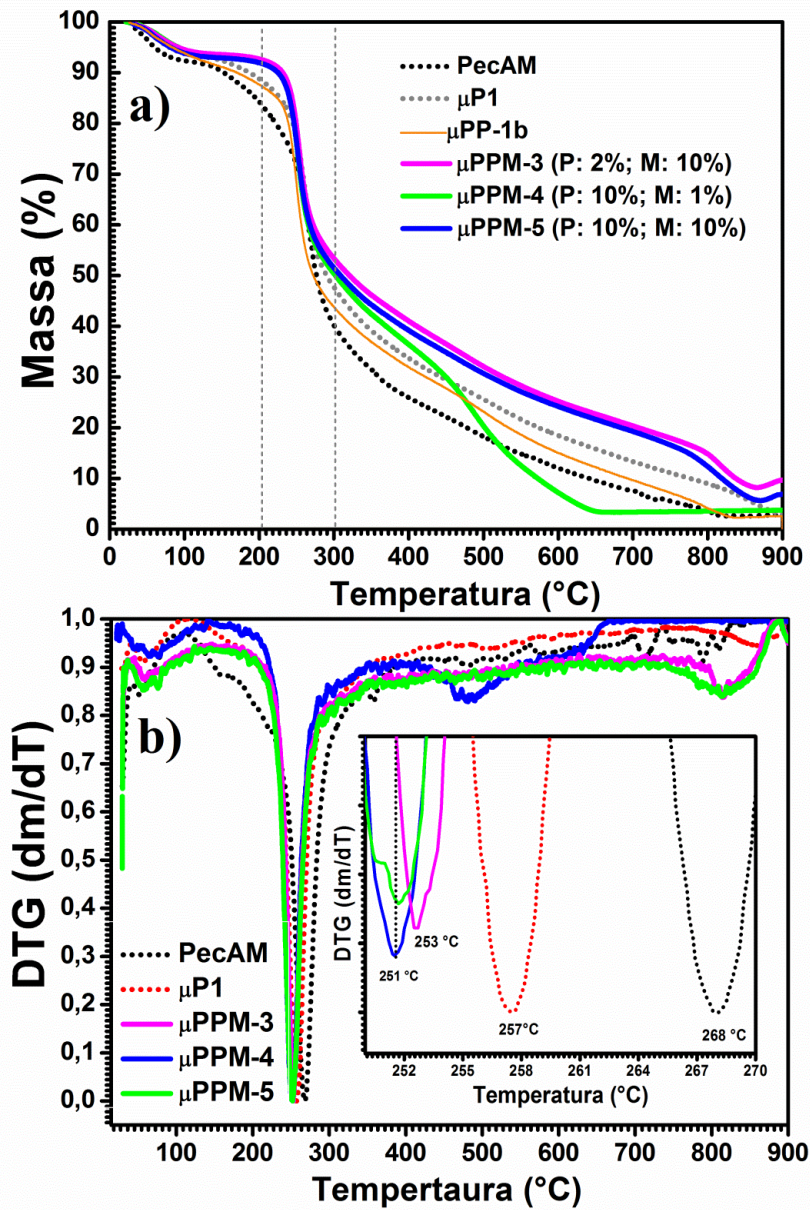
Figura 4. 9. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  da PNIPAAm, PecAM,  $\mu\text{P1}$  e  $\mu\text{PP-1b}$ .

A quantidade de átomos de Fe presentes nas microesferas foi determinada por espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS), com a análise de Fe total. Determinou-se que a quantidade

de Ferro (em gramas) encapsulado por grama de amostra ( $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5) é  $4,67 \times 10^{-2}$ ,  $5,84 \times 10^{-3}$  e  $3,71 \times 10^{-2}$ , respectivamente, sendo as respectivas eficiências de encapsulamento iguais a 31,0 %, 39,0 % e 25,0 %.

A análise termogravimétrica confirma a quantidade de Fe encapsulada nas amostras por meio do perfil apresentado pelas amostras, Figura 4.9.a. No estágio inicial da degradação a presença do Fe altera o perfil das curvas. A presença da magnetita nas amostras diminui a perda de massa a temperaturas próximas a 200 °C. Observa-se que nesta faixa de temperatura as amostras que contêm magnetita apresentam menor perda de massa, quando comparadas com as microesferas formadas apenas de PecAM ( $\mu$ P-1), ou PecAM/PNIPAAm ( $\mu$ PP-1b). Por outro lado, o ponto máximo de degradação das amostras com magnetita ocorre a temperaturas menores do que da PecAM e das microesferas  $\mu$ P1, visualizado melhor no gráfico de DTG, Figura 4.9.b. Mas é importante ressaltar que após o máximo de degradação, em torno de 300 °C, as amostras com magnetita apresentam massa residual entre 48-53%, enquanto as amostras sem magnetita apresentam resíduo a 300 °C em torno de 38-48%. Além disso, as curvas de TG das amostras  $\mu$ PPM-3 e  $\mu$ PPM-5 a 900 °C apresentaram 9,95% e 7,0% de resíduo, respectivamente. Tal fato confirma a presença de magnetita e sugere que o encapsulamento na formulação  $\mu$ PPM-3 foi mais eficiente do que na formulação  $\mu$ PPM-5, o que está de acordo com os resultados de absorção atômica. No caso da formulação  $\mu$ PPM-4, a quantidade de magnetita encapsulada é muito pequena, para visualizar alterações significativas nas curvas de TG a 900 °C.





**Figura 4. 10.** (a) Curvas de TG e (b) Curvas de DTG, amostras PecAM,  $\mu$ P1,  $\mu$ PP-1-b,  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4,  $\mu$ PPM-5.

#### 4.4.3. Análise da sensibilidade das partículas $\mu$ PPM-3, $\mu$ PPM-4 e $\mu$ PPM-5 ao Campo Magnético

A sensibilidade ao campo magnético é determinada pelas características do ciclo de histerese (Arias, Ruiz et al. 2008). Como observado em outros trabalhos, o comportamento magnético de compósitos contendo magnetita é semelhante ao das nanopartículas de magnetita pura, exceto que o

conteúdo polimérico reduz a magnetização da amostra (Arias, Lopez-Viota et al. 2007); (Jaiswal, Banerjee et al. 2010).

Na Figura 4.10 são apresentados os ciclos de histerese das microesferas  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4,  $\mu$ PPM-5 e magnetita (inset). O máximo de magnetização para as nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) puras foi  $64,4 \pm 0,5 \text{ emu.g}^{-1}$ , enquanto o máximo de magnetização para as microesferas (magnetita encapsulada) foi  $6,2 \pm 0,1 \text{ emu.g}^{-1}$ ,  $0,68 \pm 0,01 \text{ emu.g}^{-1}$  e  $4,20 \pm 0,05 \text{ emu.g}^{-1}$  para as formulações  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5, respectivamente (Figura 4.10). Os baixos valores da magnetização das microesferas compósitas podem ser atribuídos à presença da maior quantidade de polímero. Apesar da redução da sensibilidade magnética, as microesferas compósitas satisfazem os requisitos propostos, sua superfície pode ser comparada à do polímero puro e, além disso, elas têm a propriedade de ser magnetizadas. Assim, são candidatas para serem utilizadas na liberação controlada de fármacos induzida pelo processo de magnetização.

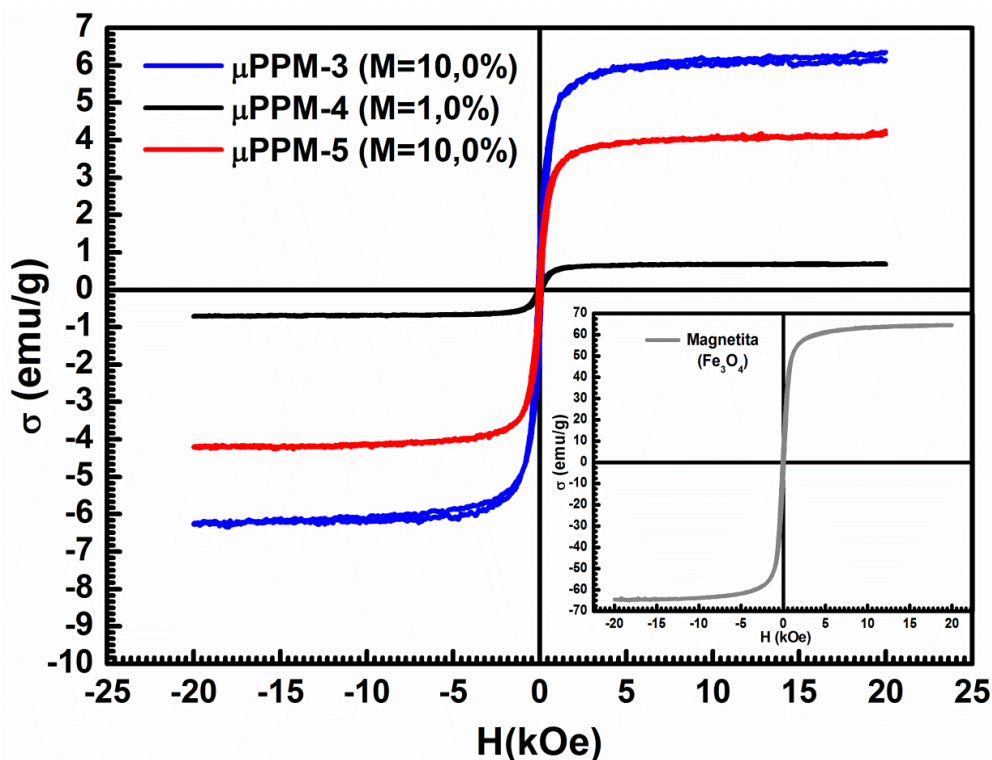


Figura 4. 11. Ciclos de histerese das microesferas  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4,  $\mu$ PPM-5 e magnetita (inset).

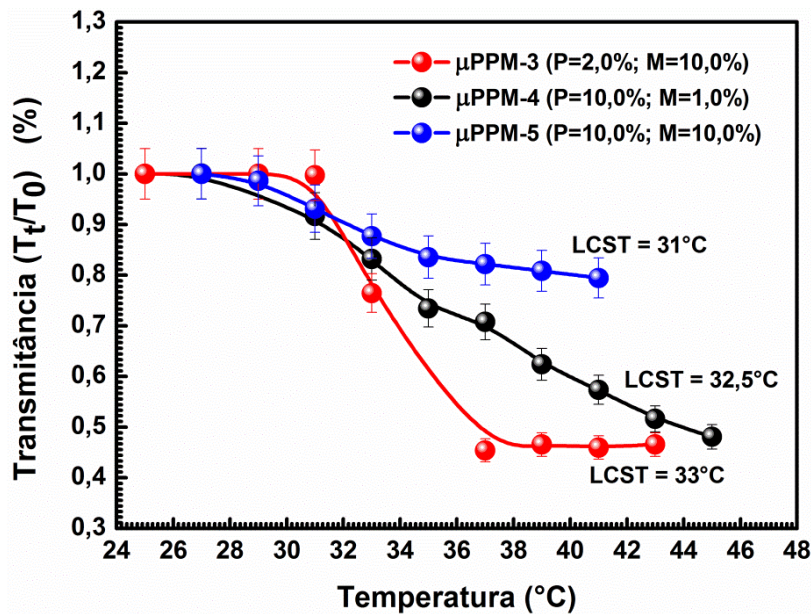
#### **4.4.4. Sensibilidade à Temperatura**

##### **4.4.4.1. Medida da LCST por luz transmitida através das partículas**

A sensibilidade das microesferas a variação de temperatura foi determinada a partir de medidas de intensidade relativa de luz transmitida através de uma solução diluída, tampão fosfato, pH 7, contendo as microesferas obtidas de uma determinada formulação.

A partir de curvas como as apresentadas na Figura 4.11 foi determinado o valor da LCST para as partículas contendo PNIPAAm a partir do aumento da opalescência da solução com o aumento de temperatura. A opalescência é devido à transição de fase do PNIPAAm de hidrofílica para hidrofóbica. O valor da LCST foi admitido como sendo o ponto de inflexão de cada uma das curvas da Figura 4.11.

De acordo com os dados obtidos, a quantidade de magnetita presente na amostra parece influenciar no valor da LCST. De forma que a maior diferença entre a quantidade de PNIPAAm e magnetita utilizados, resulta em valores de LCST maiores. Esta tendência está de acordo com a verificada no trabalho de (*Jaiswal, Banerjee et al. 2010*), no qual foram obtidos nanogéis baseados em PNIPAAm/Quitosana e nanopartículas de magnetita, nas quais observou-se que maiores porcentagens de magnetita resultam em maiores valores de LCST.



**Figura 4. 12.** Intensidade relativa de luz transmitida através das soluções contendo as microesferas  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 ou  $\mu$ PPM-5.

#### 4.4.4.2. Medidas de diâmetro médio

Verifica-se na Figura 4.12 que o diâmetro médio das microesferas  $\mu$ P1, em solução, é constante no intervalo de temperatura analisado (25 a 50 °C). Isto era esperado, uma vez que essas microesferas não contêm o PNIPAAm nem magnetita. Esperava-se, no entanto, observar uma única transição na dependência do valor de diâmetro com a temperatura, para as amostras contendo PNIPAAm, mas a amostra  $\mu$ PPM-3, apresentou diferentes variações no diâmetro com o aumento de temperatura (possivelmente devido a várias transições).

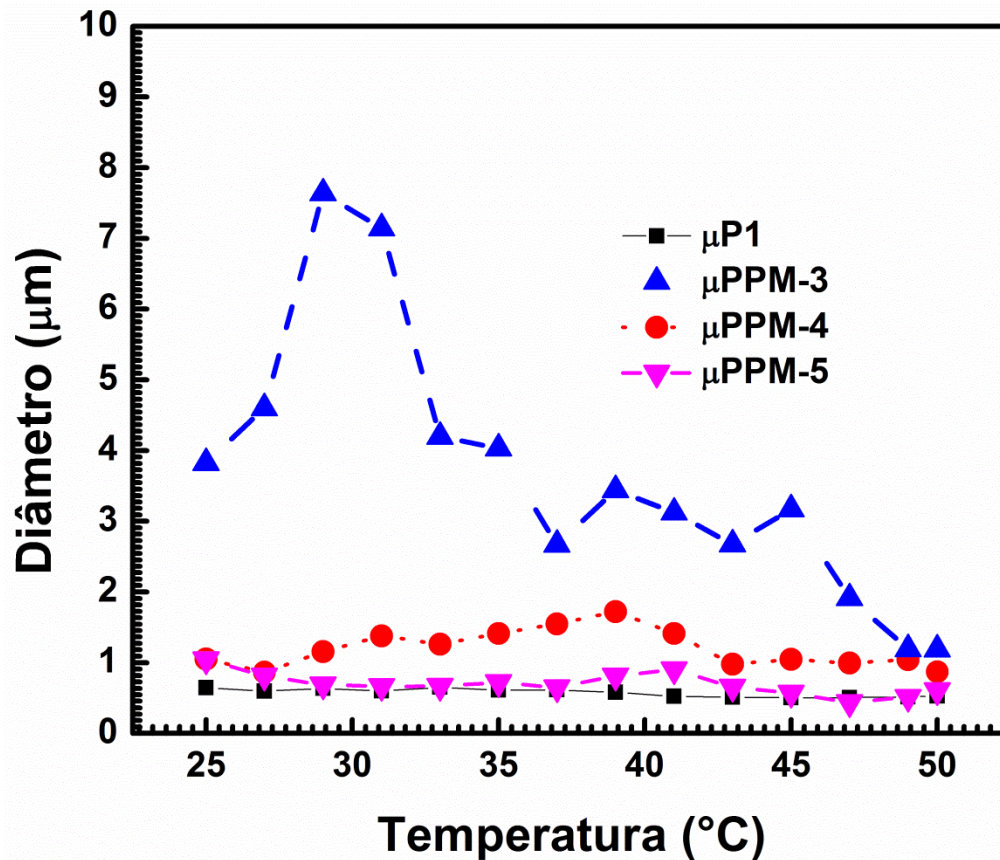


Figura 4. 13. Variação do diâmetro das microesferas com o aumento de temperatura.

Dentre as amostras estudadas, as microesferas  $\mu\text{PPM-3}$  foram as que apresentaram maior diâmetro a 25 °C (solução PBS, pH 7). Inicialmente, o aumento de temperatura dessa amostra resulta em maior diâmetro em aproximadamente 30 °C, o que indica um aumento do caráter hidrofílico. Em seguida, ocorre o decréscimo no diâmetro das microesferas em aproximadamente 32 °C, indicando a transição de um material hidrofílico para hidrofóbico. Após, retomam a hidrofiliicidade, aumentando o diâmetro de partícula, entre 37-43 °C. Acima de 43 °C as microesferas  $\mu\text{PPM-3}$  apresentaram comportamento hidrofóbico pois o diâmetro médio decresce gradativamente, atingindo um valor mínimo em cerca de 50 °C. As microesferas  $\mu\text{PPM-4}$  apresentam um discreto incremento no diâmetro até ca. de 39 °C e tende a diminuir após esta temperatura. O incremento no diâmetro das microesferas  $\mu\text{PPM-5}$  é ainda mais discreto e a diminuição do diâmetro nestas só ocorre acima de 41 °C.

Em relação às partículas  $\mu$ PPM-3, as microesferas  $\mu$ PPM-4 e as microesferas  $\mu$ PPM-5, apresentaram, inicialmente, maior caráter hidrofóbico, pois possuem menores diâmetros. No entanto, acima de 27 °C o caráter hidrofílico das partículas  $\mu$ PPM-4 tende a aumentar (devido ao aumento no diâmetro), mas acima de 41°C tende a diminuir.

O comportamento observado torna o material obtido muito interessante, uma vez que as partículas apresentaram maior caráter hidrofóbico quando acima de 37 °C ( $\mu$ PPM-3) e acima de 43 °C ( $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5). Isso significa que o aumento da temperatura leva a coalescência das redes de PNIPAAm e a consequente liberação do fármaco.

#### 4.4.4.3 Medidas de Potencial Zeta

As medidas de potencial zeta também podem ser usadas para determinar a LCST de um sistema (*Pietsch, Mansfeld et al. 2012*). No entanto, o comportamento observado não ocorreu como o esperado.

Em contato com uma solução aquosa eletrolítica, partículas adquirem cargas em sua superfície como resultado de processos de adsorção ou ionização. Com o objetivo de avaliar a existência de possível repulsão eletrostática entre as microesferas, o potencial elétrico de superfície foi avaliado usando potencial zeta. Na Figura 4.13 é descrita a dependência do potencial zeta com a temperatura da suspensão aquosa das microesferas, para três diferentes formulações  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5.

As curvas demonstram que os valores de potencial zeta são negativos nas condições estudadas. Inicialmente, até aproximadamente 37 - 38 °C, as microesferas apresentam valores de potencial de superfície relativamente semelhantes. No entanto, o aumento a partir desta temperatura até aproximadamente 43 °C resulta em diferentes comportamentos de acordo com a composição. Nesta faixa de temperatura (38 a 43 °C), as microesferas  $\mu$ PPM-3 e  $\mu$ PPM-5 exibem maiores

densidades de cargas negativas na superfície, o que está relacionado à maior estabilidade do sistema. Por outro lado, a composição  $\mu$ PPM-4 apresentou menor densidade de cargas negativas na superfície, comparado com o seu estado inicial (Thammawong, Sreearunothai et al. 2012).

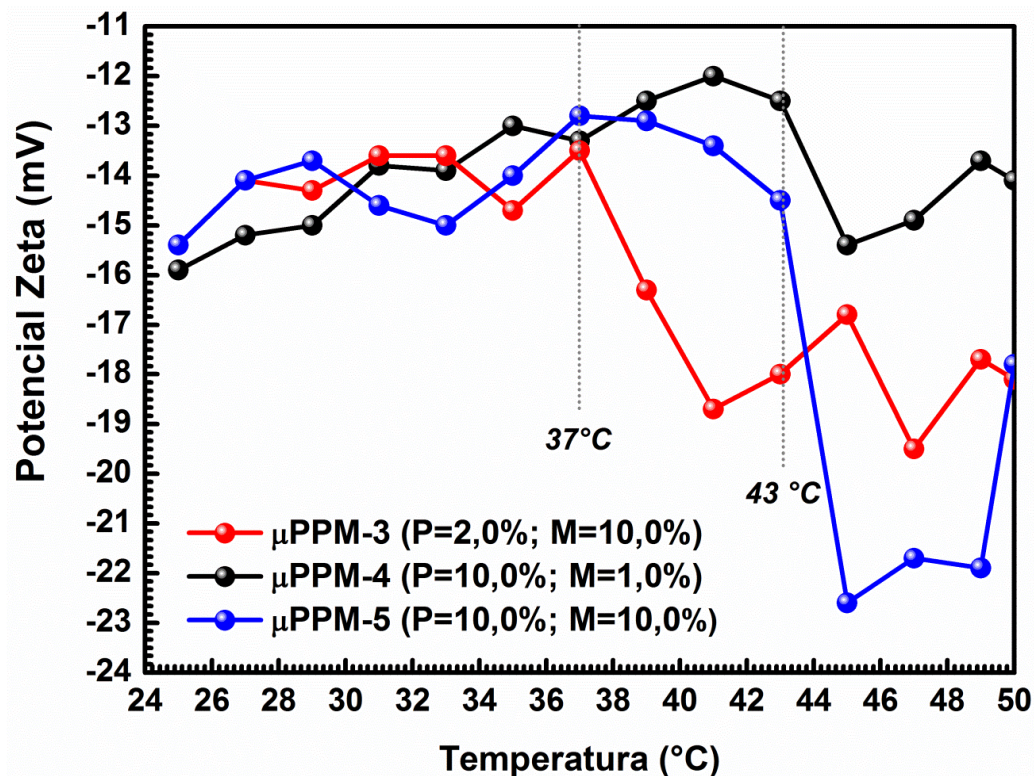


Figura 4. 14. Potencial Zeta em função da temperatura.

Em 41 °C, 45 °C e 50 °C as microesferas  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5, respectivamente, adquirem tendência a diminuir sua estabilidade coloidal, uma vez que as cargas na superfície tornam-se menos negativas.

## 4.5. CONCLUSÕES

Foram obtidas microesferas com tamanhos médios dentro do intervalo de 0,5-26  $\mu$ m, constituídas de PecAM-co-PNIPAm/Magnetita (formulações tipo  $\mu$ PPM); com a concentração de 2,5 % m/v de PecAM e 3,0 % m/m de PVA. Partículas obtidas com formulação usando PecAM e

NIPAAm, na presença ou ausência de PVA, não apresentam geometria esférica. Formulações usando PecAM e Magnetita apresentaram-se mais favoráveis para a formação de microesferas. Desta forma, infere-se que há sinergia no sistema constituído de PecAM-co-PNIPAAm/Magnetita, no qual interações entre todos os componentes conduzem a formação de microesferas mais estáveis e organizadas. A presença da magnetita nas partículas  $\mu$ PPM foi confirmada por DRX e EDX e por absorção atômica (FAAS). Por absorção atômica foi mostrado que as microesferas  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5 apresentaram concentração de Fe (dada como: g de Fe por g de amostra) iguais a  $4,67 \times 10^{-2}$ ,  $5,84 \times 10^{-3}$  e  $3,71 \times 10^{-2}$ , representando, respectivamente, eficiência de encapsulamento de 31,0%, 39,0% e 25,0%. Além disso, as microesferas  $\mu$ PPM-3,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5 apresentaram, respectivamente, sensibilidade ao campo magnético com máximo de magnetização (em  $\text{emu.g}^{-1}$ ) de  $6,2 \pm 0,1$ ;  $0,68 \pm 0,01$  e  $4,20 \pm 0,05$ .

A presença de PNIPAAm foi confirmada pelo aparecimento de sinais entre  $\delta$  1,55-1,20 ppm no espectro de RMN- $^1\text{H}$  referentes aos grupos metileno e metil terminais das cadeias de PNIPAAm. A sensibilidade térmica do PNIPAAm foi avaliada por curvas de intensidade relativa de luz transmitida através da amostra e medidas de potencial zeta. No entanto, os valores obtidos por estas técnicas foram diferentes. Os valores de LCST obtidos por análise de luz transmitida foi de 31 °C, 32,5 °C e 33 °C para as amostras  $\mu$ PPM-5,  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-3, respectivamente. Por outro lado as medidas do potencial zeta não apresentaram uma única transição, como esperado. Porém, é importante destacar que a amostra  $\mu$ PPM-3 apresentou caráter hidrofóbico acima de 37 °C, enquanto que as amostras  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5 apresentaram-se hidrofóbicas acima de 43 °C, o que torna esse material com potencialidades para liberação de fármacos a temperaturas acima da temperatura corpórea.



## CAPÍTULO V

ENSAIOS DE LIBERAÇÃO “*in vitro*” DE CURCUMINA

## 5.1. INTRODUÇÃO

## 5.1.1. Curcumina

A Curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), abreviada nesta Dissertação como CUR, é um pigmento difenólico, extraído do açafrão da terra, também conhecido como cúrcuma longa. As investigações sobre esse composto, suas propriedades, arquitetura molecular e eficácias multipotentes, tem mostrado que este pigmento possui variadas propriedades especialmente aquelas para o domínio biomédico. Mas também atrai interesse na ciência de materiais (Konwarh, Saikia et al. 2010). A arquitetura única de CUR confere atributos especiais para esta molécula, que pode ser útil em tratamentos anti-inflamatórios, fibrose cística, doença de Alzheimer, malária, hiperlipidemia, câncer, além disso, apresenta atividades antibacterianas e pode atuar como agente de cicatrização de feridas e como hepatoprotetor (Rejinold, Muthunarayanan et al. 2011), (Yallapu, Jaggi et al. 2012), (Martins, Bueno et al. 2013).

Dentre os estudos de maior interesse se encontra o desenvolvimento de medicamentos voltados ao tratamento do câncer; uma vez que o câncer continua a ser a segunda causa principal de morte nos EUA e, possivelmente, no mundo. Os agentes quimioterápicos convencionais, tais como os agentes alquilantes ou antimetabólitos, embora diminuam o tamanho do tumor, muitas vezes não conseguem erradicar tumores ou impedir a sua recorrência. Além disso, a eventual repetição do tratamento com esses agentes resulta em tumores que tornam-se resistentes ao tratamento quimioterápico. Portanto, é crucial identificar "produtos naturais" que inibam o crescimento tumoral e possuam propriedades de indução de apoptose das células cancerosas em humanos e que, além

disso, tenham como alvo várias vias de sinalização celular, sem resultar em problemas de toxicidade em células normais (Yallapu, Jaggi et al. 2012).

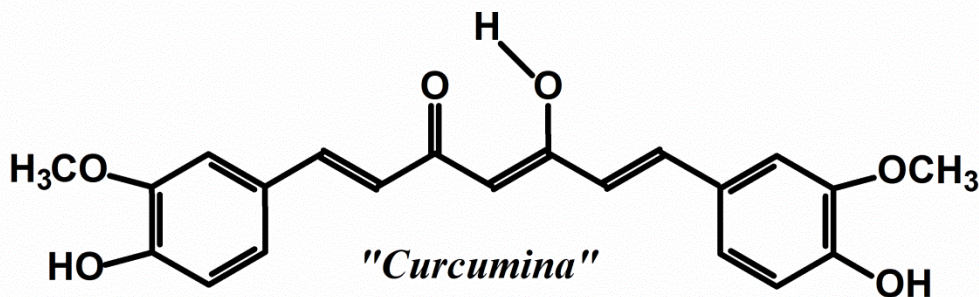
A forte atividade antiproliferativa da CUR tem atraído interesses particulares como o seu potencial de prevenção e quimioterapêutico contra o câncer (Tang, Murphy et al. 2010). A CUR tem provado ser um modulador de vias de sinalização intracelular, que controlam o crescimento celular do câncer, inflamação, invasão e apoptose, revelando seu potencial anticancerígeno. Além disso, esse medicamento possui um mecanismo de captura de radicais livres. Mais recentemente, verificou-se que a CUR atua como um antioxidante, por meio do grupo hidroxila fenólico, sendo que o mecanismo de captura dos radicais livres é orientada pela natureza do radical livre (Konwarh, Saikia et al. 2010), (Yallapu, Jaggi et al. 2012).

Estudos têm demonstrado que a Curcumina é mais eficaz em células tumorais do que os quimioterápicos convencionais e a própria radiação. “*In vitro*”, a CUR demonstrou citotoxicidade contra uma ampla variedade de linhas celulares de câncer, incluindo o carcinoma da próstata, carcinoma do pulmão, carcinoma do cólon e alguns trabalhos mostraram que a CUR “*in vivo*” tem efeitos preventivos e terapêuticos contra tumores humanos (Tang, Murphy et al. 2010), (Yallapu, Jaggi et al. 2012).

Devido às suas propriedades valiosas, atualmente cerca de 100 empresas farmacêuticas e químicas produzem vários produtos de CUR na forma de comprimidos, cápsulas, corantes, cremes, produtos lácteos, bebidas, extratos, géis, sprays nasais, e assim por diante para as necessidades diárias e assistência médica (Yallapu, Jaggi et al. 2012).

A limitação do uso da CUR é sua característica hidrofóbica, praticamente insolúvel em água e em condições ácidas. Degrada-se rapidamente em condições neutras e alcalinas, com meia vida inferior a 10 min em PBS a pH 7,2; resultando em baixa biodisponibilidade na administração tanto vascular quanto oral. Esta baixa biodisponibilidade faz com que a CUR seja inativa para inibir

tumores de pulmão e mama. A insolubilidade aquosa e instabilidade e, portanto, baixíssima biodisponibilidade impede que as aplicações clínicas a partir da CUR sejam bem sucedidas (Tang, Murphy et al. 2010).



### 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona

Figura 5. 1. Estrutura química da CUR.

Embora uma concentração de 10 ou 12 g mL<sup>-1</sup> de CUR seja administrado oralmente em humanos, os níveis no soro sanguíneo mostram cerca de 50 ng mL<sup>-1</sup>, resultando numa disponibilidade mínima de CUR na circulação sanguínea (Yallapu, Jaggi et al. 2012). Ao mesmo tempo, a CUR provou ser farmacologicamente segura, mesmo em doses muito altas, em muitos estudos clínicos e vários animais modelos. Por exemplo, estudos mostram que a ingestão diária de 8 g de CUR, por pacientes com lesões malignas, durante 3 meses, não manifestou nenhuma toxicidade (Cheng, Hsu et al. 2001). Dentre os vários esforços realizados na busca por superar as limitações da administração de Curcumina, a entrega por meio de dispositivos de liberação controlada de fármacos (hidrogéis, partículas, entre outros) tem sido amplamente explorada (Martins, Bueno et al. 2013). A Curcumina carregada em lipossomas (Li L, Ahmed B et al. 2007), (Marczylo, Verschoyle et al. 2007), (Chen, Johnston et al. 2009) em nanopartículas (Cartiera, Ferreira et al. 2010), (Anand, Nair et al. 2010), ou conjugado com dendrímeros hidrossolúveis de polia(amida imina) ou de PAMAM, melhorou sua solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade (Shi, Dolai et al. 2007).

Uma proposta para solucionar as limitações dos fármacos usados no tratamento contra o câncer, como a CUR, é encapsular o fármaco em um material biocompatível que possa ser injetado na corrente sanguínea, podendo o dispositivo entregar o fármaco no local do tumor. Pesquisadores estão focados no desenvolvimento de sistemas poliméricos solúveis em água, sensíveis a estímulos externos, demonstrando transição de fase em resposta a estímulos tal como temperatura, pH, íons, campo magnético ou elétrico, entre outros (Rejinold, Sreerekha et al. 2011).

Formulações altamente estáveis são necessárias para aproveitar ao máximo o efeito EPR (permeação e retenção melhorada) no tratamento de tumores sólidos e para o direcionamento térmico, utilizando a hipertermia para direcionar o medicamento encapsulado para as células cancerosas, alvo, onde a droga pode então ser liberada “*in situ*”. Uma vez que a CUR é específica para o tratamento de células cancerosas, uma maior eficácia pode ser atingida por meio da utilização de um sistema transportador do tipo LCST (Rejinold, Sreerekha et al. 2011).

Desta forma, propõe-se nesta parte desta Dissertação realizar ensaios de liberação de CUR a partir do sistema de microesferas termosensíveis e magnéticas preparadas com as formulações  $\mu$ P-1 e  $\mu$ PPM-4 (Capítulo 4) e baseadas em pectina modificada (PecAM) como descrito no Capítulo 2.

## 5.2. OBJETIVOS

Avaliar o perfil de liberação da Curcumina a partir de microesferas termosensíveis e magnéticas preparadas com as formulações  $\mu$ P-1 e  $\mu$ PPM-4, preparadas conforme descrito nos Capítulos 2, 3 e 4 desta Dissertação.

## 5.3. EXPERIMENTAL

### 5.3.1 Materiais

Álcool etílico absoluto P.A., acetona P.A., cloreto de sódio P.A. (NaCl, 99,5 %) e ácido clorídrico P.A. (HCl, 37 %) foram fornecidos pela F. Maia (Brasil). Fosfato de potássio monobásico P.A. (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 98 %) e hidróxido de sódio P.A. (NaOH, 97%) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). Curcumina (CUR) adquirida da Sigma Aldrich (China). Tubos para diálise de 32 mm de diâmetro, (membrana de celulose provenientes da Sigma Aldrich (Alemanha)).

### 5.3.2. Procedimentos

#### 5.3.2.1. Carregamento de Curcumina (CUR) nas microesferas $\mu P-1$ e $\mu PPM-4$ .

Para carregar as microesferas com a CUR, 1,0 mg do fármaco foi solubilizado em 100 mL de etanol e, em seguida, cerca de 1,0 g de microesferas foi transferida para a solução. O sistema foi mantido sob agitação magnética durante 20 h à temperatura ambiente e, em seguida, as microesferas foram separadas por centrifugação. Uma curva analítica foi construída a partir de soluções padrões de CUR, de concentrações entre 0,08-5,0 mg L<sup>-1</sup>, usando etanol como solvente.

#### 5.3.2.2. Liberação “*in vitro*” de Curcumina

Os estudos de liberação de CUR *in vitro* foram realizados em fluído intestinal simulado [SIF, 6,80 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 77 mL de solução aquosa de NaOH 0,20 mol L<sup>-1</sup> em 1 L de água destilada, pH = 6,8] e fluído gástrico simulado [SGF, 2,0 g de NaCl e 7,0 mL de uma solução aquosa concentrada de HCl a 37% (v/v) em 1 L de água destilada, pH = 1,2].

Os estudos de liberação foram realizados em um dissolutor (*home-made*: montado no nosso laboratório). Para cada estudo, 100 mg de microesferas secas e carregadas com CUR foram depositadas em uma membrana de celulose preenchida com 30 mL de SGF ou SIF. As membranas foram acopladas a frascos selados com 220 mL de SGF ou SIF. Para cada condição, a medida foi

realizada em triplicata ( $n = 3$ ). Depois de mergulhar a membrana contendo as microesferas carregadas no fluido desejado, cada amostra foi mantida sob agitação mecânica (40 rpm), em temperaturas determinadas, 25 °C ou 37 °C, na ausência ou na presença de campo magnético. O campo magnético foi gerado por ímãs circulares, de intensidade máxima 63,8 Oe e 93,0 Oe para o ímã circular médio e para o ímã circular grande, respectivamente, acoplados externamente ao sistema de liberação, onde ocorreu a liberação (Gráficos do CM gerado pelos ímãs, Figura A3, em anexo).

Uma alíquota (ca. 3,0 mL) era removida do frasco em tempos específicos e a quantificação da CUR liberada foi realizada por medidas de UV-Vis. As condições experimentais estão resumidas na Tabela 5.1, a seguir.

**Tabela 5. 1.** Condições estabelecidas para o estudo de liberação “*in vitro*” de Curcumina, a partir das microesferas  $\mu$ P-1 e  $\mu$ PPM-4.

Amostra	25 °C		37 °C	
	$\mu$ P-1	SIF	SGF	SIF
$\mu$ PPM-4	SIF	SGF	SIF	SGF
	SIF-CM	SGF-CM	SIF-CM	SGF-CM

CM: Presença de campo magnético.

### 5.3.2.3. Cinética de Liberação

A determinação do mecanismo de difusão de solutos a partir das microesferas foi realizada aplicando a equação semi-empírica proposta por Ritger e Peppas a qual pode prever apenas 60 % inicial da liberação (Ritger P. L. 1987), Equação 5.1.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{(Equação 5.1)}$$

onde  $M_t/M_\infty$  é a fração de fluido liberado em um determinado tempo,  $k$  é uma constante cinética, que depende da geometria da matriz e  $n$  é o expoente difusional que pode ser relacionado ao mecanismo de transporte de fluidos (Brazel and Peppas 1999) (Guilherme, Reis et al. 2010).

Além disso, aplicou-se o modelo de Reis et al. aos perfis de liberação de CUR (quantidade liberada em função do tempo). Este modelo é baseado na existência de difusão/partição entre soluto/matriz e soluto/meio externo e descreve completamente o perfil de liberação de solutos (Reis, Guilherme et al. 2007). Reis et al. considera o processo de liberação a partir de matrizes tridimensionais como um processo de transporte difusional e como um fenômeno de partição, no qual a partição de solutos ocorre entre as fases, solvente e hidrogel. A fração de soluto liberada,  $F_L$ , está relacionada a um parâmetro de liberação designado com atividade de partição ( $\alpha$ ), o qual determina a ocorrência dos fenômenos de partição (Reis, Guilherme et al. 2007). De acordo com o modelo de Reis et al., para sistemas nos quais a liberação de um soluto segue uma cinética reversível de primeira ordem, a Equação 5.2 é aplicada.

$$F_L = F_{max} ( 1 - e^{-(k_L/F_{max})t} ) \quad \text{(Equação 5.2)}$$

Por outro lado alguns sistemas a liberação segue uma cinética de segunda ordem, na qual a Equação 5.3 é aplicada.

$$F_L = \frac{F_{max} (e^{2(k_L/\infty)t} - 1)}{1 - 2 F_{max} + e^{2(k_L/\infty)t}} \quad \text{(Equação 5.3)}$$

Nas equações  $\alpha = F_{max}/(1 - F_{max})$ ,  $k_L$  é a constante de velocidade de liberação e pode ser calculada por meio da Equação 5.4.1 para sistemas de primeira ordem e por meio da Equação 5.4.2 para sistemas de segunda ordem, sendo  $F_{max}$  a fração máxima liberada.

$$k_L t = F_{max} \ln\left(\frac{F_{max}}{F_{max} - F_L}\right) \quad \text{(Equação 5.4.1)}$$

$$K_L t = \frac{\alpha}{2} * \ln \frac{F_L - 2F_L * F_{max} + F_{max}}{F_{max} - F_L} \quad \text{(Equação 5.4.2)}$$

#### 5.3.2.4. Avaliação da citotoxicidade sobre células Caco-2

Células Caco-2 (célula de adenocarcinoma de cólon humano) foram cultivadas usando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco®) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino - Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina. A cultura foi mantida em garrafas plásticas com tampa de rosca e dispositivo para entrada de CO<sub>2</sub> e incubadas a 37°C em estufa úmida com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> (Fischer Scientific®, modelo Isotemp). Sempre que a monocamada de células encontrava-se confluenta era procedida a renovação ou repique da cultura, utilizando solução de tripsina-EDTA a 37°C.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método da Sulforrodamina B, descrito por (Skehan, Storeng et al. 1990) com algumas modificações. Células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços. Após a formação da monocamada confluenta, em aproximadamente 24 h, o meio antigo foi retirado e 100 µl de DMEM foi adicionado em cada poço. Em seguida, o meio foi



retirado e 100 µl das amostras foram adicionados em cada poço, em triplicata. Foram testadas as concentrações de 0,1 µg mL<sup>-1</sup>, 1 µg mL<sup>-1</sup>, 10 µg mL<sup>-1</sup>, 100 µg mL<sup>-1</sup>, 500 µg mL<sup>-1</sup> e 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Após a adição dos compostos, a placa foi incubada por 48 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio foi removido de cada poço foi lavado com PBS (tampão fosfato salina) estéril. Para fixação, foram adicionados, em cada poço, 50 µl de ácido tricloroacético à 10% (SYNTH<sup>®</sup>) por 1h sob refrigeração e ao abrigo de luz. Após, a placa foi lavada 4 vezes em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secar. Após a secagem da placa, adicionou-se, a cada poço, 50 µl de uma solução a 0,4% de sulforrodamina B (Sigma<sup>®</sup>) em ácido acético 1%. A placa foi incubada novamente sob refrigeração e ao abrigo da luz por 30 min. Em seguida, o corante foi retirado e a placa lavada 4 vezes com ácido acético glacial à 1% para remoção do corante em excesso. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µl de solução Tris-base 10mM. Após, determinou-se a absorbância em leitor de ELISA (Bio-Tek<sup>®</sup>, modelo Power Wave XS) a 530 nm.

Os resultados foram comparados com o controle de células e a citotoxicidade foi determinada pela destruição celular provocada pelos compostos, pela equação abaixo:

$$\% \text{ de toxicidade celular} = 100 - (\text{DO}_{\text{tto}} / \text{DO}_{\text{cc}}) \quad (\text{Equação 5.5})$$

onde: DO<sub>tto</sub> = densidade óptica das células tratadas, DO<sub>cc</sub> = densidade óptica do controle de células. O CC<sub>50</sub> (dose tóxica para 50% das células) foi determinado pela análise de regressão de curva dose-resposta.

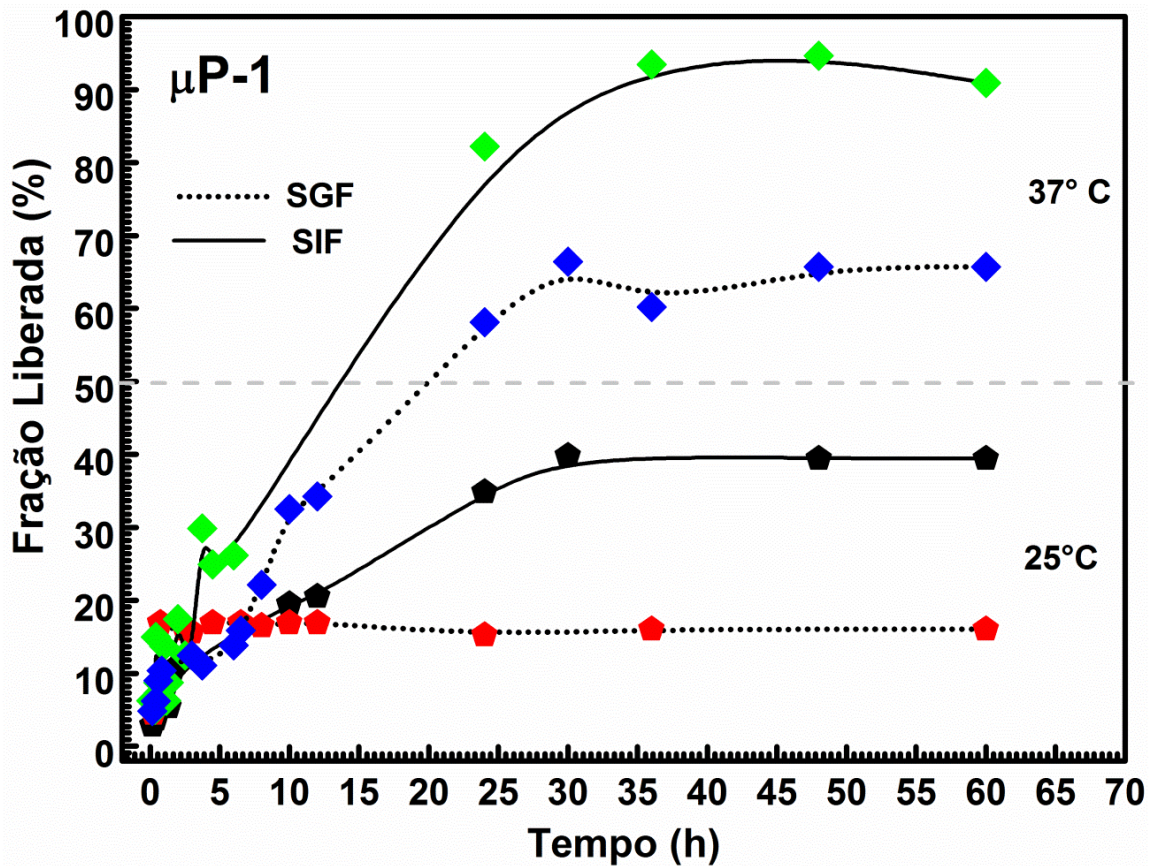
## 5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1. Ensaio de Liberação de Curcumina

Na Figura 5.2 são apresentados os perfis de liberação de CUR a partir de microesferas  $\mu$ P-1 em SIF e SGF a 25° C e 37° C. De acordo com a quantidade máxima liberada de CUR, determinou-se a eficiência de encapsulamento, aproximadamente 60%, ou seja, 0,6 mg de CUR, foi encapsulado em cada grama de microesferas.

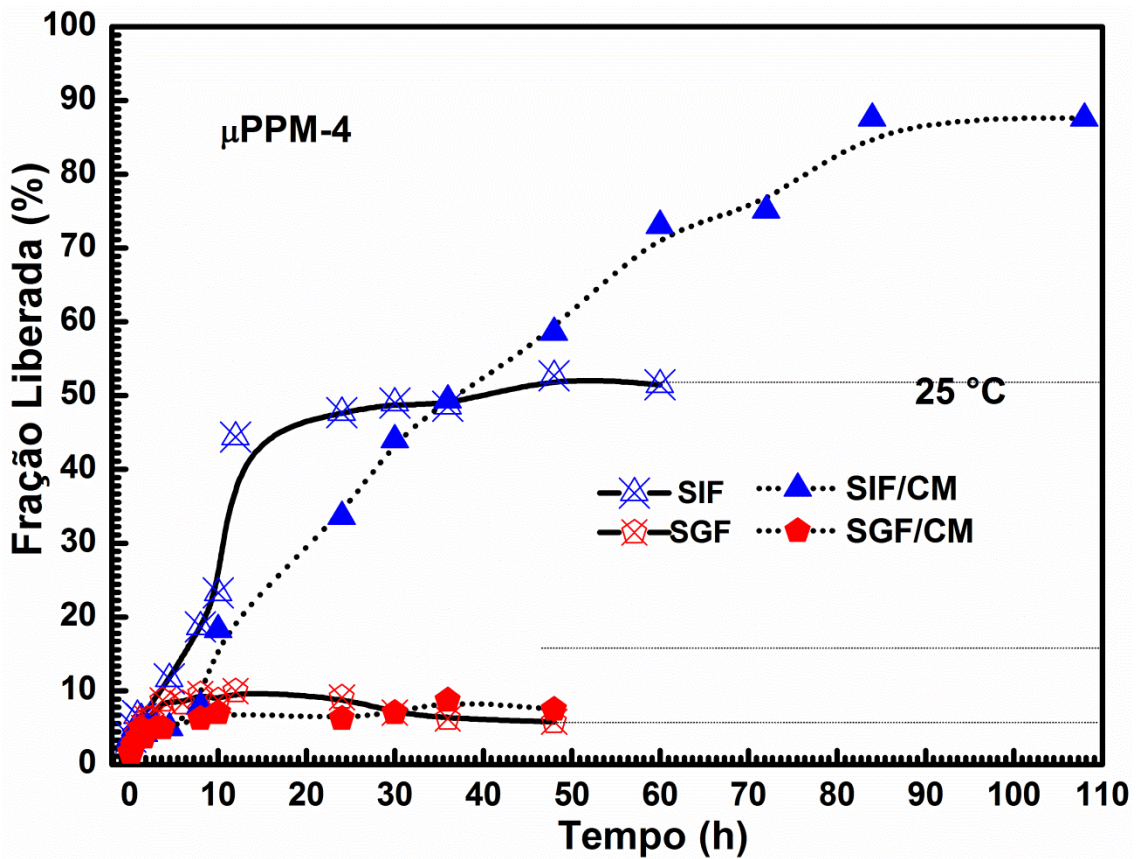
Observou-se que a liberação da CUR a partir de partículas do tipo  $\mu$ P-1 é favorecida a 37 °C, principalmente em contato com o fluido de simulação intestinal (SIF), na qual foram liberados, após 35 h, cerca de 98% da CUR encapsulada. No mesmo intervalo de tempo, foram liberados em SGF aproximadamente 65% da CUR encapsulada em partículas do tipo  $\mu$ P-1. Embora o sistema  $\mu$ P-1 não contenha a PNIPAAm, verificou-se que em temperaturas menores o dispositivo libera menor concentração de CUR, ca. de 40% em SIF e 16% SGF, como mostrado na Figura 5.2.

Os perfis de liberação observados para o sistema  $\mu$ PPM-4 são mostrados na Figura 5.3. No entanto, o ensaio de liberação foi realizado também na presença de campo magnético. A partir dos ensaios realizados, observou-se que o campo magnético afeta consideravelmente apenas a liberação da CUR em SIF a 25° C, resultando na liberação de maiores concentrações do fármaco, atingindo até 88% da fração encapsulada, em aproximadamente 100 h de ensaio. Na ausência do campo magnético a fração de CUR liberada é ligeiramente superior a 50%, atingindo o equilíbrio após 20 h de liberação. Os perfis de liberação de CUR a partir das partículas de  $\mu$ PPM-4 em SGF e SGF/CM são apresentados na Figura 5.3. Verifica-se que neste meio a fração de CUR liberada é menos que 10% e não é afetada pela presença do campo magnético.



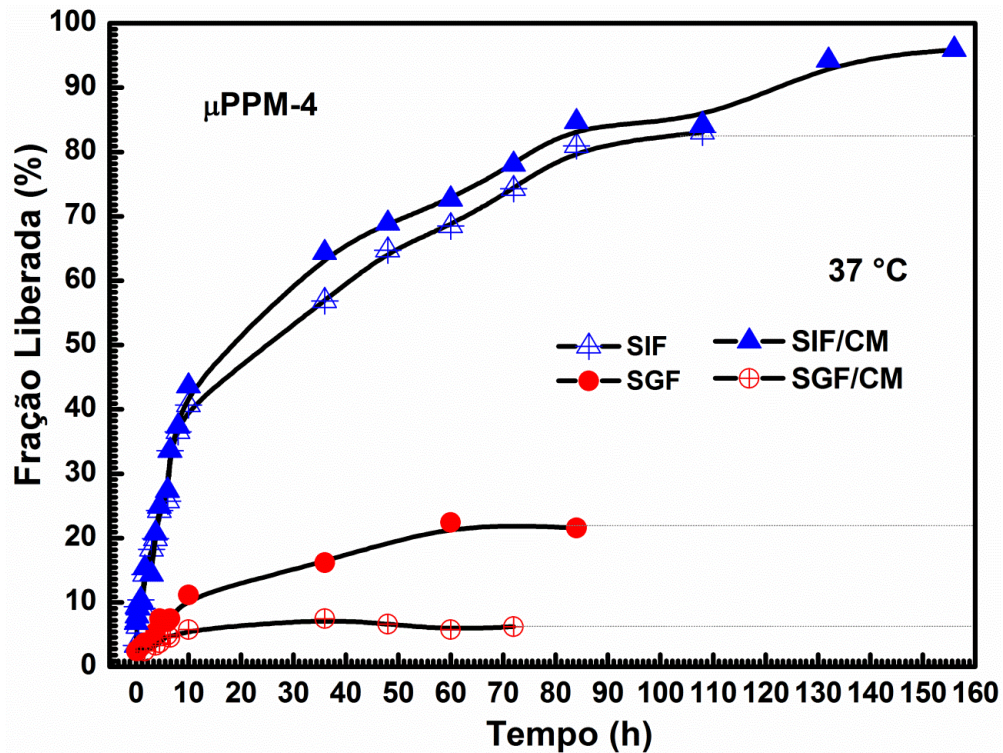
**Figura 5. 2.** Perfis de liberação de CUR a partir de microesferas  $\mu\text{P-1}$  em SIF e SGF a  $25^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ . As linhas são apenas “guias-de-olho”.

Na Figura 5.3. são apresentados os perfis de liberação de CUR a partir das microesferas  $\mu\text{PPM-4}$  em SIF e SGF a  $25^\circ\text{C}$ , na presença e ausência do campo magnético (CM). O perfil de liberação de CUR a partir das microesferas  $\mu\text{PPM-4}$ , a  $37^\circ\text{C}$  em SIF, não se altera com a presença ou ausência de campo magnético, sendo a fração liberada aproximadamente 96% e 83%, respectivamente, Figura 5.4. Enquanto isso, em SGF, observou-se diferença no perfil de liberação na ausência de campo magnético, onde a liberação foi ligeiramente maior (22% da fração de CUR encapsulada) do que na presença do campo (6% da fração de CUR encapsulada).



**Figura 5. 3.** Perfis de liberação de CUR a partir das microesferas  $\mu$ PPM-4 em SIF e SGF a 25°C, na presença e ausência do campo magnético (CM). As linhas são apenas “guias-de-olho”.

A maior liberação de CUR a partir das microesferas em contato com a solução SIF pode ser explicada pela ionização dos grupamentos carboxílicos, presentes na estrutura da PecAM, quando em contato com esta solução. A ionização destes grupos favorece a interação dos ânions carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) com as moléculas de água, levando ao intumescimento das microesferas resultando na liberação do fármaco. Esse fato contribui para que o dispositivo desenvolvido apresente potencial para ser utilizado para liberar CUR, ou outros fármacos, no ambiente intestinal, pois ele protege o fármaco na região gástrica e permite a sua liberação na região intestinal.



**Figura 5. 4.** Perfis de liberação de CUR a partir das microesferas  $\mu\text{PPM-4}$  em SIF e SGF a  $37^\circ\text{C}$ , na presença e ausência do campo magnético (CM). As linhas contínuas são apenas “guias-de-olho”.

### 5.4.2. Cinética de Liberação

De acordo com Reis et al. existe uma condição essencial para que soluto seja liberado a partir do hidrogel, designado por esse autor como um fenômeno de partição, o qual considera que a partição de um soluto ocorre entre as fases solvente/hidrogel. Para a ocorrência de tal fenômeno existe a atividade partição ( $\alpha$ ) que expressa a afinidade físico-química do soluto com ambas as fases (Reis, Guilherme et al. 2007).

Assumindo a existência dos fenômenos de partição, a difusão de soluto a partir do hidrogel para o solvente predomina até ao equilíbrio. A taxa de liberação de soluto e de carregamento pode ser estudada através da determinação da mudança de concentração de soluto no solvente como uma função do tempo (Reis, Guilherme et al. 2007).

A atividade partição ( $\alpha$ ) é definida como a razão entre as concentrações do soluto entre as fases solvente/hidrogel e apresenta um valor constante na fase de equilíbrio (Reis, Guilherme et al. 2007). O valor de  $\alpha$  é dependente em um grande número de variáveis, tais como a temperatura, pressão, pH, força iônica, composição de hidrogel, geometria do hidrogel, grau de intumescimento do hidrogel, e da natureza química do solvente e do soluto. Como as variáveis podem assumir um número infinito de valores, há um grande número estados de equilíbrio possíveis e, por isso, um grande número de valores para  $\alpha$ . Quando  $\alpha > 0$ , a difusão de soluto ocorre entre as fases solvente/hidrogel, implicando que quanto maior o valor de  $\alpha$  maior é afinidade entre o soluto e o solvente.

A difusão é um fenômeno molecular, onde o material se move a partir de uma determinada coordenada espacial para outro devido ao movimento aleatório das moléculas, que é causada pela sua energia térmica (Reis, Guilherme et al. 2007) (E.L. Cussler 1997).

O modelo de Reis et. al prevê o perfil global da liberação de solutos “*in vitro*” a partir de hidrogéis, ou seja, 100% de soluto liberado. Além disso, tanto a difusão Fickiana e os mecanismos controlados pelo relaxamento macromolecular e a geometria do hidrogel são considerados neste modelo como fatores intrínsecos, nos parâmetros  $\alpha$  e  $k_L$ .

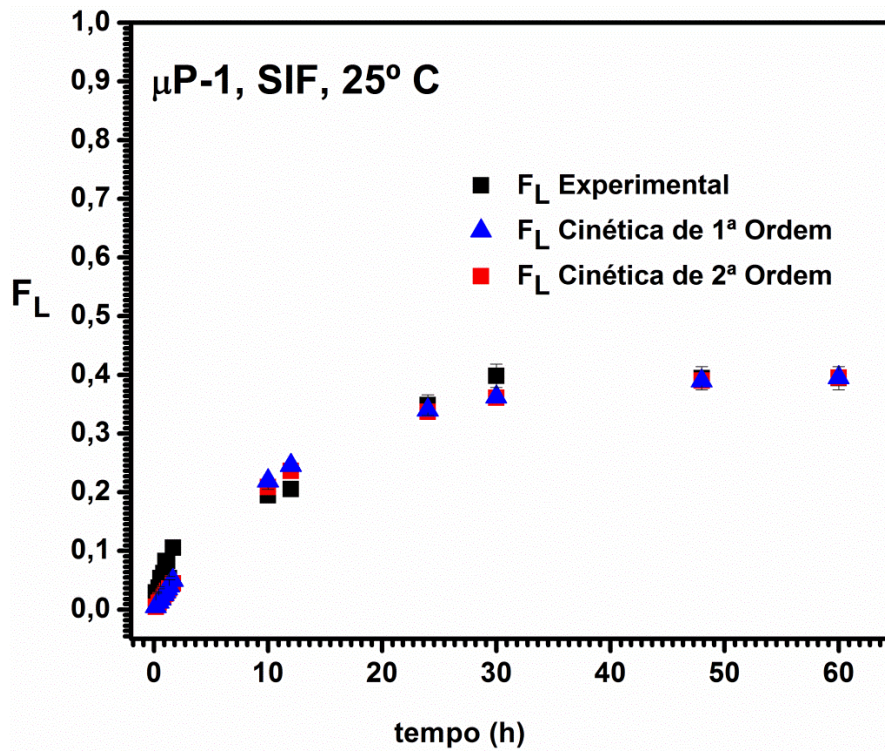
Quando  $\alpha = 0$ , não há liberação de soluto, mas quando  $\alpha > 0$ , observa-se a difusão do soluto entre as fases solvente/hidrogel e, em seguida, os processos de liberação que são dependentes do tempo e da absorção do soluto passam a ocorrer concomitantemente.

Os valores do coeficiente de determinação,  $R^2$ , obtidos ao aplicar as equações do modelo cinético de difusão/partição de primeira e de segunda ordem, reversível, aos dados de liberação de CUR (perfis apresentados nas Figuras 5.2 a 5.4) estão resumidos na Tabela 5.2, juntamente com os valores de  $R^2$  obtidos ao aplicar o modelo proposto por Ritger e Peppas àqueles mesmos dados.

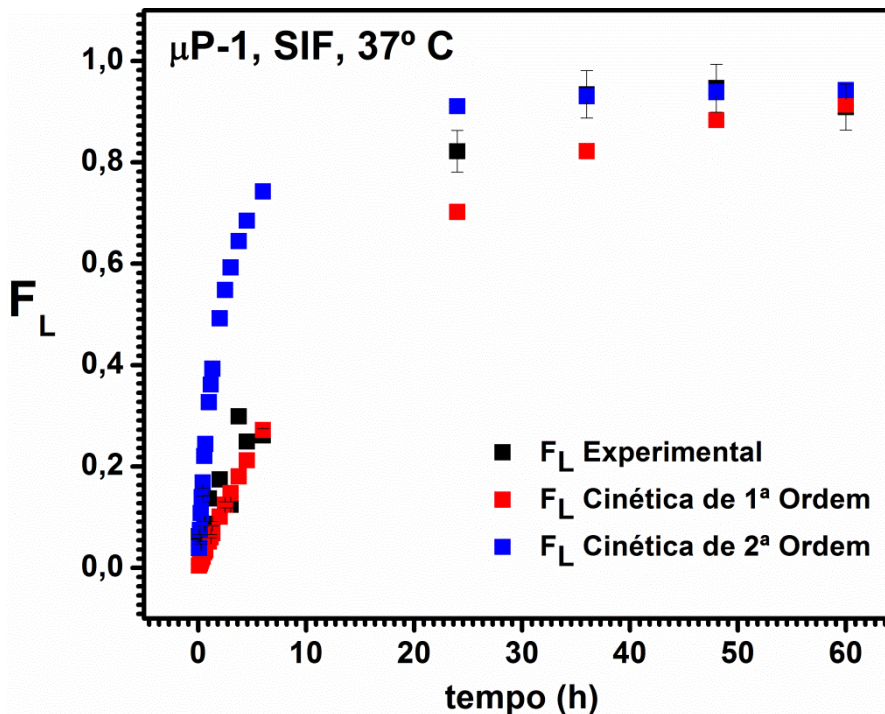
**Tabela 5. 2.** Parâmetros obtidos pela aplicação dos modelos propostos por Ritger e Pepas (Eq. 5.1) e por Reis et. al (Eq. 5.2 a 5.4) aos perfis de liberação de CUR.

Amostras	(°C)	Modelo de Pepas			Modelo Reis et al.				
		n	K	R <sup>2</sup>	$\alpha$	R <sup>2</sup> (1 <sup>a</sup> Ordem)	R <sup>2</sup> (2 <sup>a</sup> Ordem)	k <sub>L</sub> (10 <sup>-2</sup> ) 1 <sup>a</sup> Ordem    2 <sup>a</sup> Ordem	
$\mu$ P1	25	0,47	-1,17	0,966	0,66	0,977	0,978	3,25	2,80
$\mu$ P1	37	1,0	2,0	1,0	17,62	0,958	0,919	5,33	48,50
$\mu$ PPM-4	25	0,451	-1,17	0,9285	1,11	0,897	0,899	3,30	3,70
$\mu$ PPM-4	25/CM	0,153	-1,17	0,7058	7,05	0,977	0,927	2,35	4,20
$\mu$ PPM-4	37	0,479	-0,93	0,9404	4,89	0,973	0,980	2,33	4,00
$\mu$ PPM-4	37/CM	0,465	-0,89	0,9576	23,24	0,962	0,964	1,98	5,22

Nas Figuras 5.5 a 5.10, a seguir, são apresentados os perfis de liberação experimental e os obtidos pela aplicação dos modelos para a cinética de liberação de primeira e de segunda ordem, de acordo com (Reis, Guilherme et al. 2007) aos perfis de liberação de Curcumina. De acordo com os resultados apresentados (Figuras 5.5 a 5.10), o modelo de difusão/partição se sobrepõe bem aos perfis de liberação de Curcumina. Pode ser observado também que não houve diferença significativa na aplicação dos modelos de cinética de primeira e de segunda de liberação aos perfis de liberação de Curcumina tanto a 25 quanto a 37 °C em SIF e em SGF, na presença ou ausência de campo magnético.

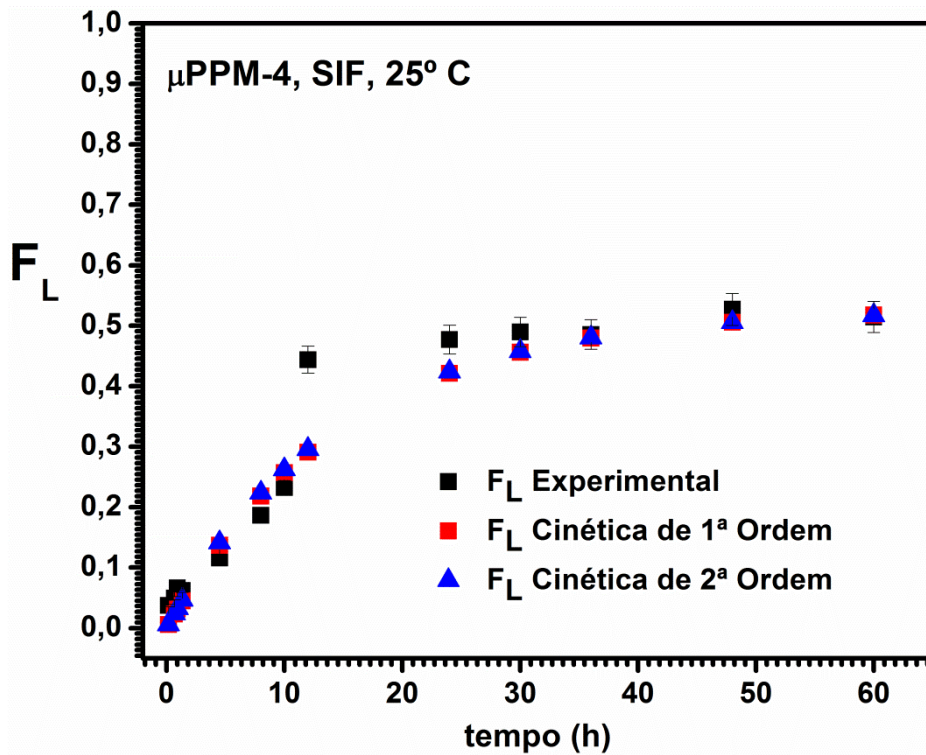


**Figura 5. 5.** Valores de fração liberada ( $F_L$ ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2., para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da  $\mu$ P-1, a 25° C, em SIF.

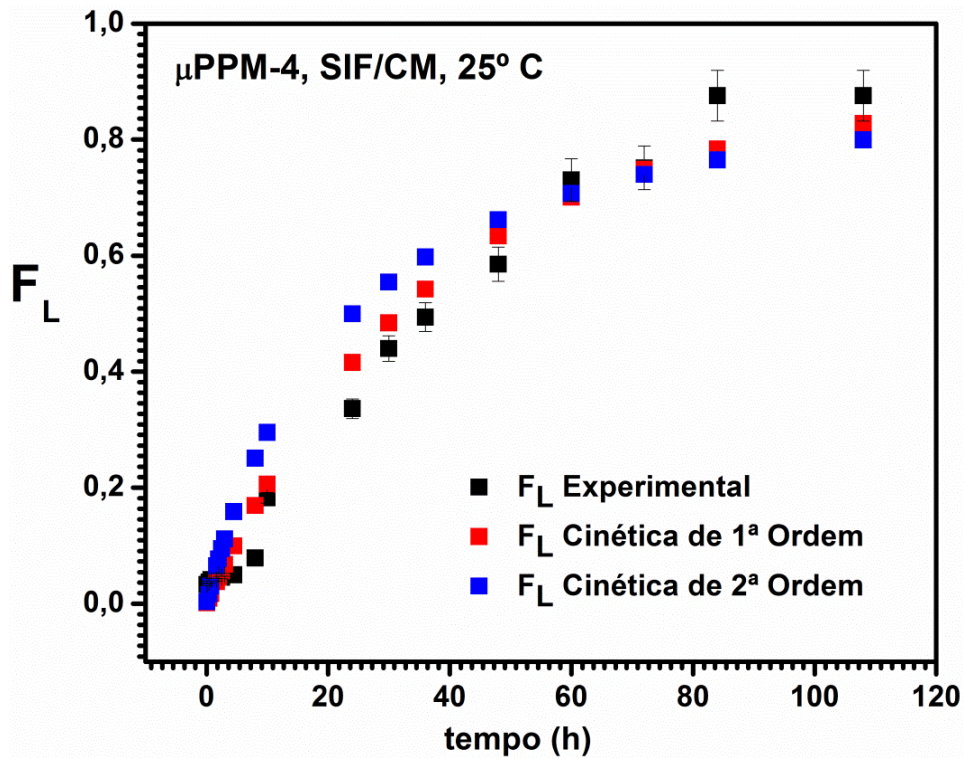


**Figura 5. 6.** Valores de fração liberada ( $F_L$ ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2, para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da  $\mu$ P-1, a 37° C, em SIF.

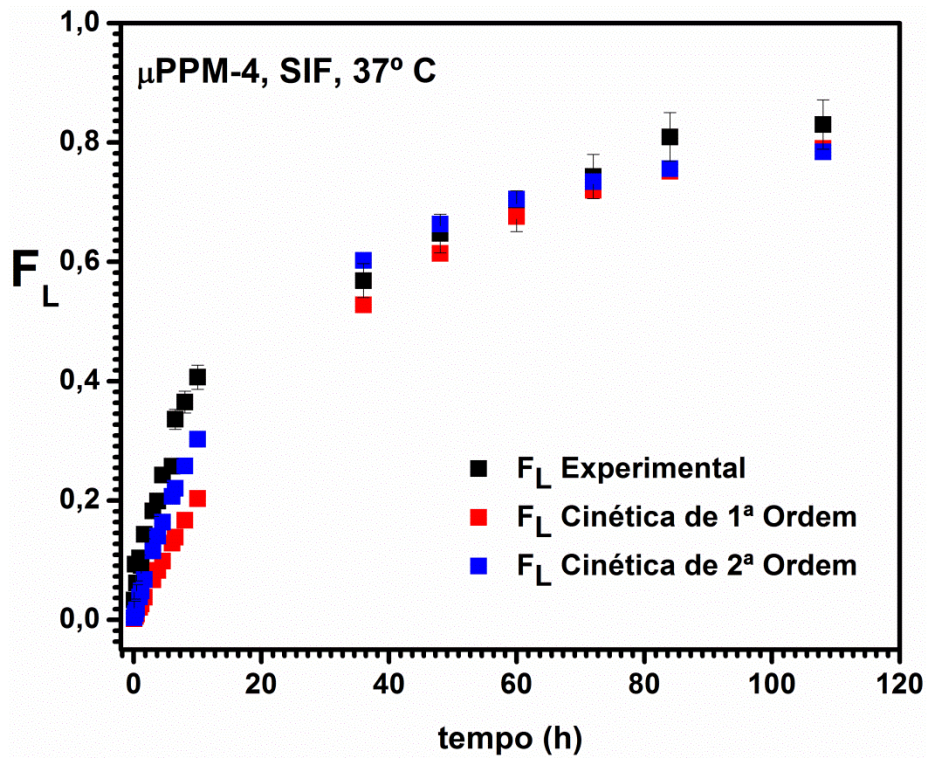




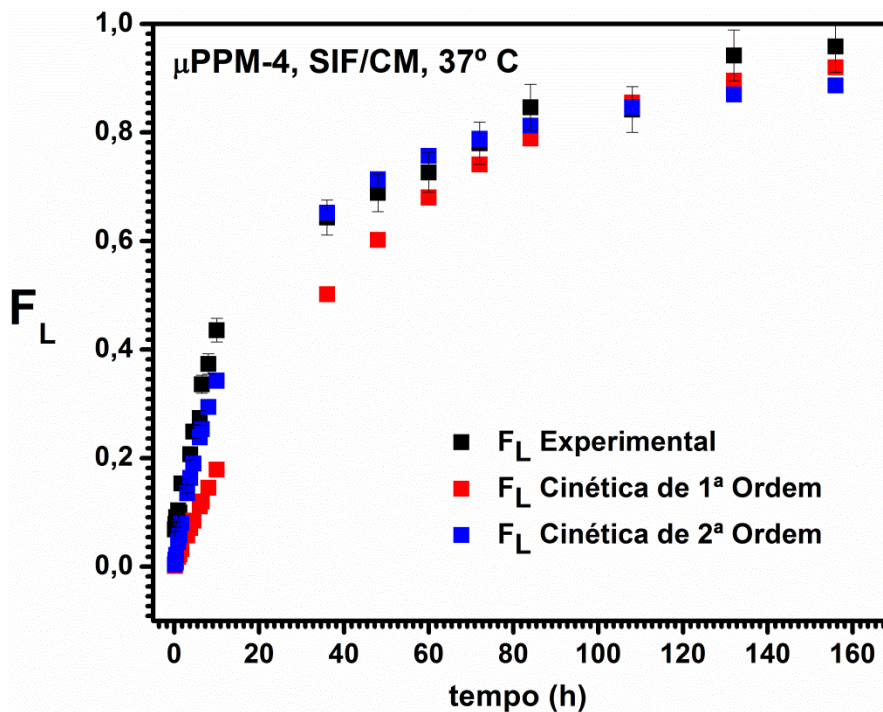
**Figura 5. 7.** Valores de fração liberada ( $F_L$ ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2, para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da  $\mu$ PPM-4, a 25° C, em SIF.



**Figura 5. 8.** Valores de fração liberada ( $F_L$ ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2, para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da  $\mu$ PPM-4, a 25° C, em SIF, na presença de campo magnético (CM).



**Figura 5. 9.** Valores de fração liberada ( $F_L$ ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2., para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 4.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da  $\mu$ PPM-4, a 37° C, em SIF.



**Figura 5. 10.**  $F_L$  Valores de fração liberada ( $F_L$ ) experimental e os obtidos da Eq. 5.2., para cinética de primeira ordem reversível, e Eq. 5.3., para cinética de segunda ordem reversível, contra o tempo, para da  $\mu$ PPM-4, a 37° C, em SIF, na presença de campo magnético (CM).

Tendo em vista os resultados apresentados, pode-se inferir que a liberação de Curcumina a partir das partículas obtidas das formulações  $\mu\text{P-1}$  e  $\mu\text{PPM-4}$  pode ser explicada pelos modelos propostos por Reis et. al ou por Ritger e Pepas.

### **5.4.3. Efeito citotóxico sobre células tumorais Caco-2**

O efeito citotóxico das amostras de Pec, PecAM,  $\mu\text{P1}$ ,  $\mu\text{PPM-3}$ ,  $\mu\text{PPM-4}$  e  $\mu\text{PPM-5}$ , foi avaliada, frente ao crescimento de células cancerígenas Caco-2. De acordo com o gráfico apresentado na Figura 5.11, verificou-se que a PecAM apresentou maior efeito inibitório para o crescimento de células Caco-2, quando comparada com a Pec. Esse fato, está de acordo com a hipótese de que materiais copolimerizados com o AM, apresentam maior atividade antitumoral.

Entre as microesferas ( $\mu\text{P1}$ ,  $\mu\text{PPM-3}$ ,  $\mu\text{PPM-4}$  e  $\mu\text{PPM-5}$ ), constatou-se que a adição de PNIPAAm e Magnetita auxilia no efeito inibitório, quando comparadas com as microesferas sintetizadas exclusivamente com a PecAM. No entanto, verificou-se que concentrações altas de ambos (PNIPAAm e Magnetita) conduzem a um menor efeito inibitório do crescimento das células Caco-2, não sendo interessante portanto trabalhar com concentração alta destes.

De acordo com esses resultados, espera-se que o carregamento das microesferas com CUR, conduza a maior inibição de crescimento de células Caco-2 e outras células tumorais, fazendo com que estes sistemas tenham grande potencial de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos anticâncer.

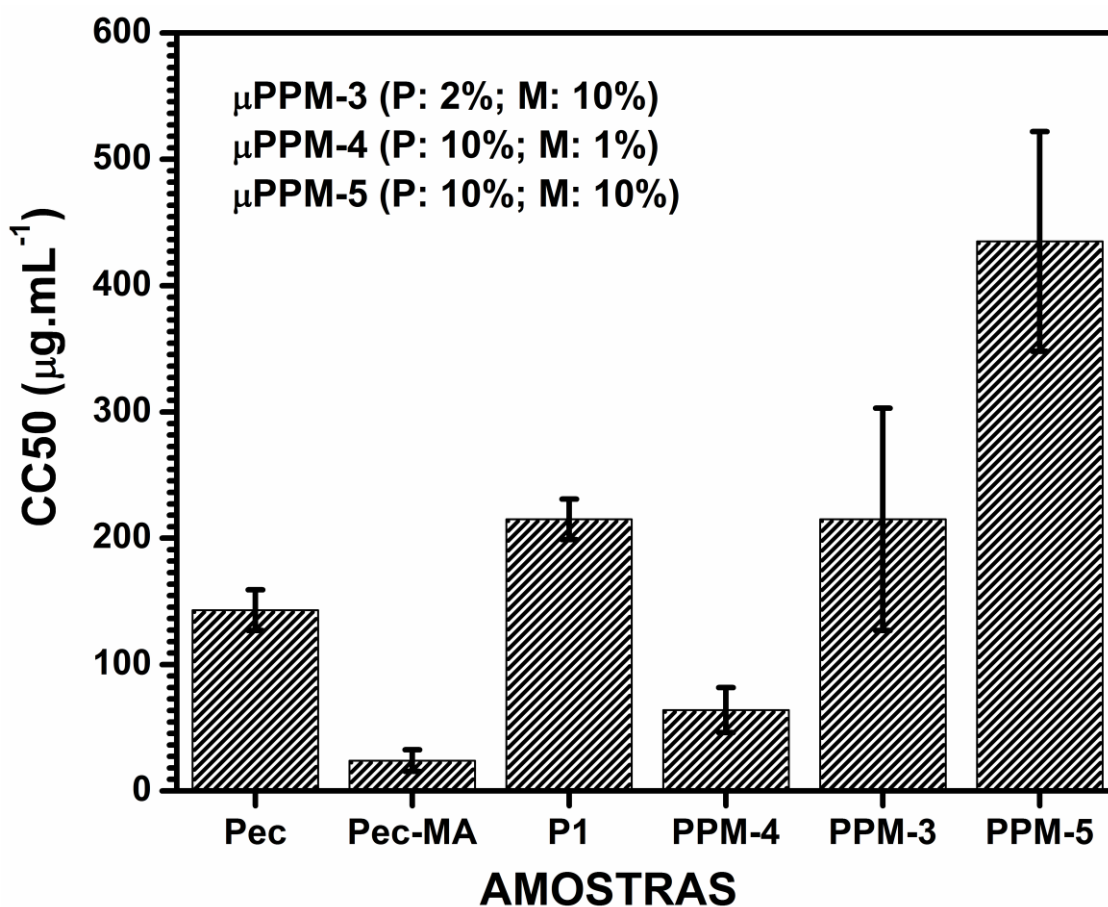


Figura 5. 11. Avaliação *in vitro* dos efeitos citotóxicos das amostras Pec, PecAM,  $\mu$ P1,  $\mu$ PPM-3  $\mu$ PPM-4 e  $\mu$ PPM-5 frente o crescimento de células tumorais Caco-2.

## 5.5. CONCLUSÕES

Os ensaios de liberação controlada de Curcumina (CUR) foram realizados em diferentes meios (SGF e SIF), empregando as microesferas obtidas em diferentes formulações  $\mu$ P-1 e  $\mu$ PPM-4 como sistemas de liberação. Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios, uma vez que quase 100% da CUR foi liberada em solução SIF a 37 °C em um período de 120 a 150 h. Em SGF a fração liberada é bem menor. Isto mostra que as partículas atuam eficientemente para proteger as CUR da acidez estomacal e permite que seja liberada gradualmente no intestino. Os estudos cinéticos mostraram que a liberação a partir das microesferas sintetizadas ocorre devido ao fenômeno de partição em conjunto com os fenômenos de difusão e relaxamento macromolecular, podendo ser explicada pelos modelos de Ritger-Pepas e Reis et. al. Os estudos de citotoxicidade mostraram que a PecAM tem atividade inibitória ao crescimento de células Caco-2 maior do que a Pec. Além disso, a formulação  $\mu$ PPM-4, foi a formulação de microesferas que apresentou maior atividade inibitória no crescimento de células Caco-2, dentre as formulações contendo PNIPAAm e Magnetita estudadas. Este fato, nos permite concluir que a adição de PNIPAAm e Magnetita, em concentrações específicas e otimizadas, contribui para a melhor atividade antitumoral deste sistema.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSÃO GERAL

1. A PecAM foi obtida, com sucesso, por meio da reação de transesterificação da Pec com AM e a ocorrência da modificação foi confirmada por meio das análises de FTIR e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .
2. Foram obtidas microesferas de PecAM,  $\mu\text{P1}$ , e de PecAM-co-PNIPAm/Magnetita,  $\mu\text{PPM}$ ;
3. A presença da magnetita nas microesferas  $\mu\text{PPM}$  foi confirmada por DRX, EDX e absorção atômica (FAAS).
4. As microesferas  $\mu\text{PPM}$  apresentaram sensibilidade magnética, a qual foi determinada por análise de amostra vibrante.
5. Os dispositivos apresentaram sensibilidade térmica evidenciada por potencial zeta ( $37^\circ$ -  $43^\circ\text{C}$ ).
6. As microesferas liberaram quase 100% da CUR encapsulada, em SIF a  $37^\circ\text{C}$ , mostrando-se satisfatórias no uso como dispositivo para liberação de CUR.
7. Ensaio biológicos revelaram que a PecAM e as microesferas  $\mu\text{PPM-4}$  apresentam efeito citotóxico sobre células Caco-2.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectiva para o uso dos hidrogéis microparticulados multirresponsivos do tipo  $\mu$ PPM (a base de PecAM contendo PNIPAAm e Magnetita) como dispositivos de liberação controlada de Curcumina, no meio intestinal. No entanto para tal aplicação, testes futuros devem ser realizados em busca de avaliar a biodegradabilidade, bioabsorção, biocompatibilidade e citotoxicidade das microesferas carregadas com CUR. Além destes, estudos de liberação de outros fármacos podem ser realizados e os respectivos perfis de liberação analisados pelos modelos de Ritger & Peppas, Reis et. al., entre outros.

Espera-se que a aplicação dos dispositivos desenvolvidos nesta Dissertação na liberação de fármacos anticâncer, permita o direcionamento de tratamento unicamente para o local afetado, por meio da variação de intensidade de campo magnético, o qual por sua vez levará ao aquecimento das partículas magnéticas e conduzirá ao colapso do PNIPAAm, resultando na liberação do fármaco para tratar as células doentes. Neste sentido, faz-se necessário melhorar as propriedades dos materiais obtidos, por meio do estudo mais completo das variáveis envolvidas na síntese/preparação das partículas, a fim de obter materiais em escala nanométrica, os quais possuem ampla aplicação no tratamento anticâncer.

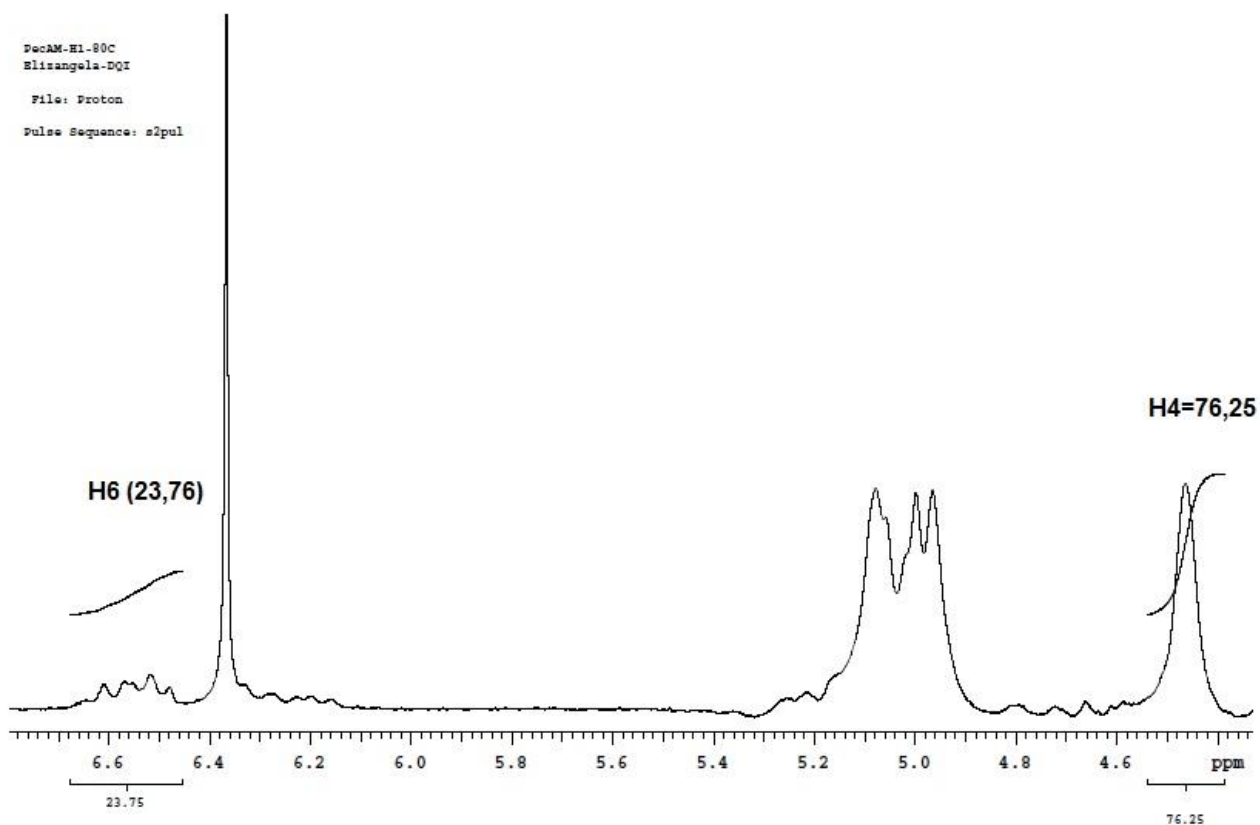
Outra área importante de estudo revelada nesta Dissertação, decorre do fato da atividade antitumoral apresentada pela PecAM. O estudo de citotoxicidade revelou que a PecAM inibe, mais significativamente, o crescimento de células Caco-2 quando comparada com as demais amostras analisadas. No entanto, sobre a atividade antitumoral apresentada pela pectina quimicamente modificada com anidrido maleico (PecAM), não há relatos na literatura. Portanto, o estudo contido nesta Dissertação pode ser ampliado, a fim de desenvolver copolímeros de AM e avaliar o potencial destes como inibidores no crescimento de células tumorais.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

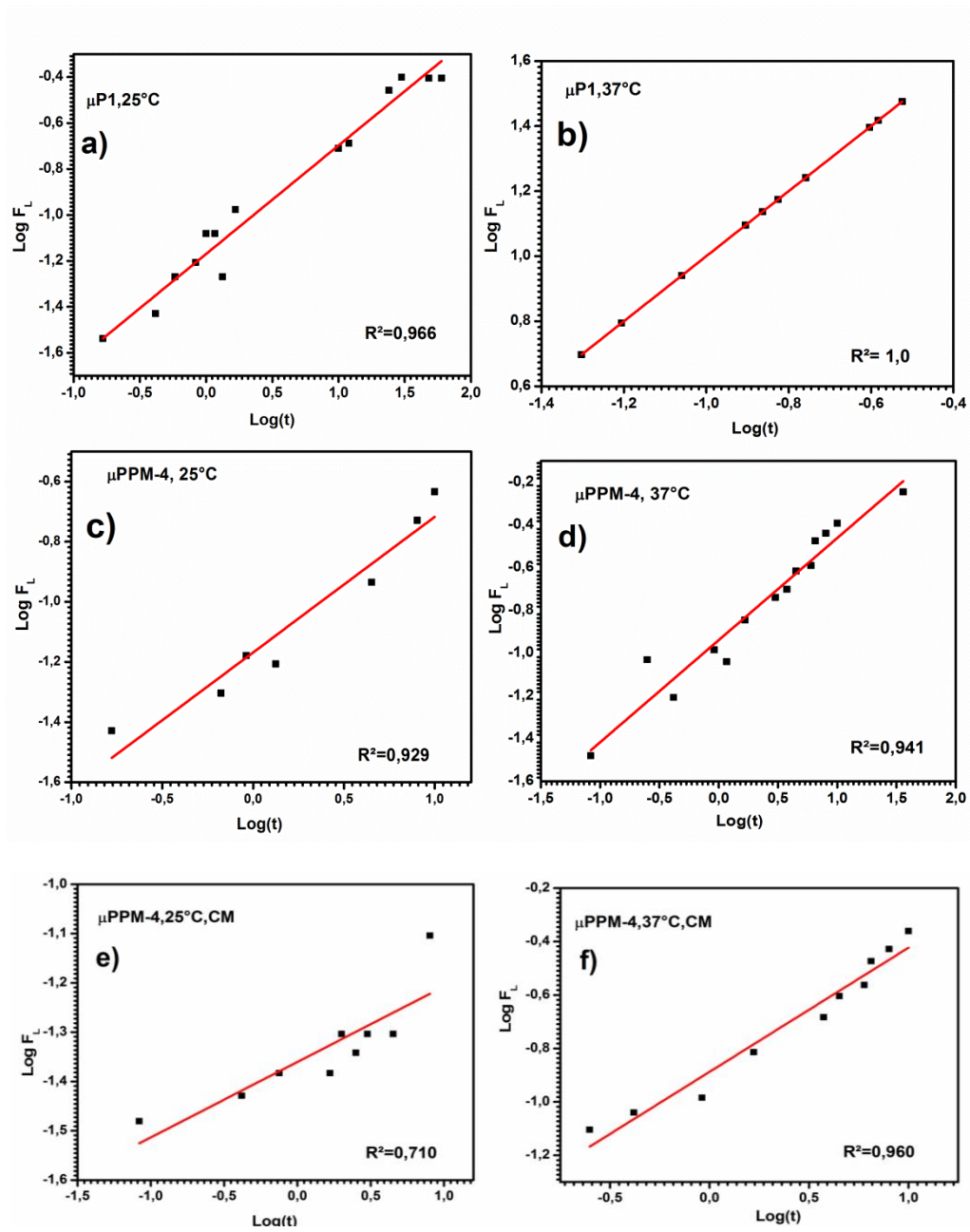
1. Avaliar a citotoxicidade das composições escolhidas sobre células saudáveis;
2. Avaliar a citotoxicidade das microesferas carregadas com CUR frente a células tumorais;
3. Estudar a liberação de diferentes fármacos a partir das microesferas desenvolvidas;
4. Sintetizar e caracterizar copolímeros de AM com diferentes polissacarídeos.



ANEXOS



**Figura A1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da PecAM, Pec e AM, obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz, obtido à  $80^\circ\text{C}$ .  
 (Capítulo 2)

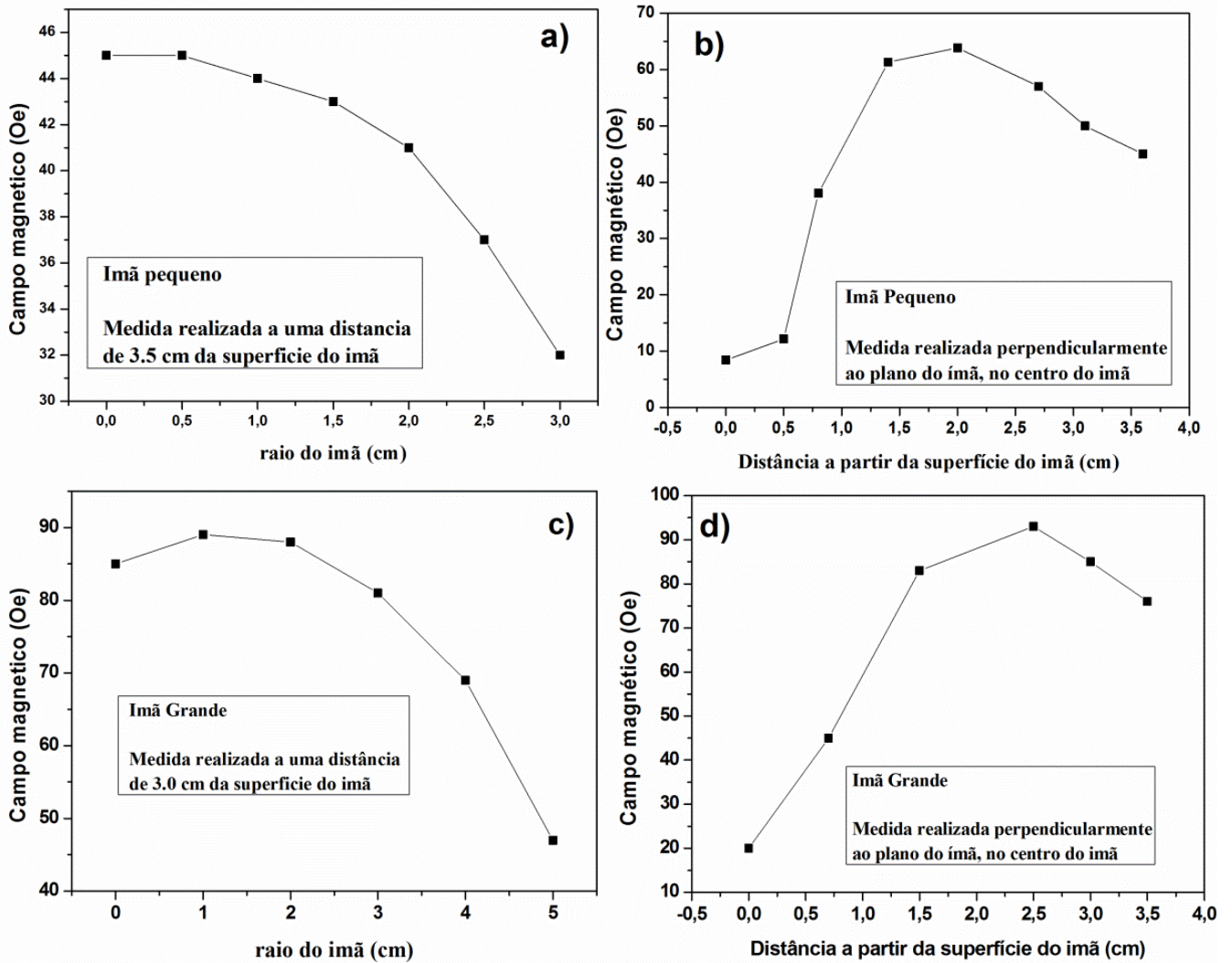


**Figura A2.** Ajustes lineares obtidos pela aplicação do modelo proposto por Ritger e Pepas (Eq. 5.1) no perfil de liberação da amostras μP1 e μPPM-4 à 25 ou a 37 °C, na ausência ou presença de campo magnético em

SIF.

*Medida de Intensidade de Campo Magnético dos ímãs utilizados para o estudo de Liberação, Capítulo 5.*

Os campos magnéticos gerados pelos ímãs foram mapeados usando um Gaussímetro Lake Shore modelo 425, equipado com sensor Hall, Lake Shore modelo HMNA-1904-VR, que possui sensibilidade de 0,01 Gauss no modo estático.



**Figura A3.** Perfil do campo magnético (CM) gerado pelos ímãs utilizados no estudo de liberação de CUR.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agnihotri, S. A., N. N. Mallikarjuna and T. M. Aminabhavi (2004). "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery." *Journal of Controlled Release* **100**(1): 5-28.
- Alveroğlu, E., H. Sözeri, A. Baykal, U. Kurtan and M. Şenel (2013). "Fluorescence and magnetic properties of hydrogels containing Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles." *Journal of Molecular Structure* **1037**(0): 361-366.
- Amsden, B. G., A. Sukarto, D. K. Knight and S. N. Shapka (2007). "Methacrylated glycol chitosan as a photopolymerizable biomaterial." *Biomacromolecules* **8**(12): 3758-3766.
- Anand, P., H. B. Nair, B. Sung, A. B. Kunnumakkara, V. R. Yadav, R. R. Tekmal and B. B. Aggarwal (2010). "Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo." *Biochemical Pharmacology* **79**(3): 330-338.
- Arias, J. L., M. Lopez-Viota, M. A. Ruiz, J. Lopez-Viota and A. V. Delgado (2007). "Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/shell nanoparticles for biomedical applications." *International Journal of Pharmaceutics* **339**(1-2): 237-245.
- Arias, J. L., M. A. Ruiz, V. Gallardo and A. V. Delgado (2008). "Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles." *Journal of Controlled Release* **125**(1): 50-58.
- Arruebo, M., R. Fernandez-Pacheco, M. R. Ibarra and J. Santamaria (2007). "Magnetic nanoparticles for drug delivery." *Nano Today* **2**(3): 22-32.
- Bajpai, A. K., S. K. Shukla, S. Bhanu and S. Kankane (2008). "Responsive polymers in controlled drug delivery." *Progress in Polymer Science* **33**(11): 1088-1118.
- Battle, X. and A. Labarta (2002). "Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties." *Journal of Physics D-Applied Physics* **35**(6): R15-R42.
- Bhattacharai, N., J. Gunn and M. Q. Zhang (2010). "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**(1): 83-99.
- Biswas, A., R. L. Shogren, S. Kim and J. L. Willett (2006). "Rapid preparation of starch maleate half-esters." *Carbohydrate Polymers* **64**(3): 484-487.
- Bouyer, E., G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.-L. Grossiord and F. Agnely (2012). "Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?" *International Journal of Pharmaceutics* **436**(1-2): 359-378.
- Brazel, C. S. and N. A. Peppas (1999). "Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers." *Polymer* **40**(12): 3383-3398.
- Brewer, E., J. Coleman and A. Lowman (2011). "Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery." *Journal of Nanomaterials*.
- Carey, F. A. (2000). "ORGANIC CHEMISTRY, Cap. 3, Conformations of Balkans and cyclamates." (4<sup>a</sup> Edition): 89-113.
- Cartiera, M. S., E. C. Ferreira, C. Caputo, M. E. Egan, M. J. Caplan and W. M. Saltzman (2010). "Partial Correction of Cystic Fibrosis Defects with PLGA Nanoparticles Encapsulating Curcumin." *Molecular Pharmaceutics* **7**(1): 86-93.
- Champion, J. A., Y. K. Katare and S. Mitragotri (2007). "Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers." *Journal of Controlled Release* **121**(1-2): 3-9.
- Champion, J. A. and S. Mitragotri (2009). "Shape Induced Inhibition of Phagocytosis of Polymer Particles." *Pharmaceutical Research* **26**(1): 244-249.
- Chen, C., T. D. Johnston, H. Jeon, R. Gedaly, P. R. McHugh, T. G. Burke and D. Ranjan (2009). "An in vitro study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells." *International Journal of Pharmaceutics* **366**(1-2): 133-139.
- Cheng, A. L., C. H. Hsu, J. K. Lin, M. M. Hsu, Y. F. Ho, T. S. Shen, J. Y. Ko, J. T. Lin, B. R. Lin, M. S. Wu, H. S. Yu, S. H. Jee, G. S. Chen, T. M. Chen, C. A. Chen, M. K. Lai, Y. S. Pu, M. H. Pan, Y. J.

- Wang, C. C. Tsai and C. Y. Hsieh (2001). "Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions." *Anticancer Research* **21**(4B): 2895-2900.
- Chichef, A., J. Skowronek, M. Kubaszewska and M. Kanikowski (2007). "Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications." *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **12**(5): 267-275.
- Cipriani, T. R., A. H. R. Gracher, L. M. de Souza, R. J. C. Fonseca, C. L. R. Belmiro, P. A. J. Gorin, G. L. Sasaki and M. Iacomini (2009). "Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects." *Thrombosis and Haemostasis* **101**(5): 860-866.
- Coimbra, P., P. Ferreira, H. C. de Sousa, P. Batista, M. A. Rodrigues, I. J. Corriea and M. H. Gil (2011). "Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications." *International Journal of Biological Macromolecules* **48**(1): 112-118.
- Coimbra, P. M. A. (2010). "Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. Dissertação." *Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra*: 268.
- Coviello, T., P. Matricardi, C. Marianecchi and F. Alhaique (2007). "Polysaccharide hydrogels for modified release formulations." *Journal of Controlled Release* **119**(1): 5-24.
- Crispim, E. G., A. F. Rubira and E. C. Muniz (1999). "Solvent effects on the miscibility of poly(methyl methacrylate)/poly(vinyl acetate) blends I: Using differential scanning calorimetry and viscometry techniques." *Polymer* **40**(18): 5129-5135.
- de Melo, J. C. P., E. C. da Silva, S. A. A. Santana and C. Airoidi (2009). "Maleic anhydride incorporated onto cellulose and thermodynamics of cation-exchange process at the solid/liquid interface." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **346**(1-3): 138-145.
- de Moura, M. R., F. A. Aouada, M. R. Guilherme, E. Radovanovic, A. F. Rubira and E. C. Muniz (2006). "Thermo-sensitive IPN hydrogels composed of PNIPAAm gels supported on alginate-Ca<sup>2+</sup> with LCST tailored close to human body temperature." *Polymer Testing* **25**(7): 961-969.
- de Souza, J. R. R., J. I. X. de Carvalho, M. T. S. Trevisan, R. C. M. de Paula, N. M. P. S. Ricardo and J. P. A. Feitosa (2009). "Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin." *Food Hydrocolloids* **23**(8): 2278-2286.
- Decuzzi, P., S. Lee, B. Bhushan and M. Ferrari (2005). "A theoretical model for the margination of particles within blood vessels." *Annals of Biomedical Engineering* **33**(2): 179-190.
- Decuzzi, P., R. Pasqualini, W. Arap and M. Ferrari (2009). "Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?" *Pharmaceutical Research* **26**(1): 235-243.
- Deligkaris, K., T. S. Tadele, W. Olthuis and A. van den Berg (2010). "Hydrogel-based devices for biomedical applications." *Sensors and Actuators B: Chemical* **147**(2): 765-774.
- Desmedt, S. C., A. Lauwers, J. Demeester, M. J. Vansteenbergen, W. E. Hennink and S. Roefs (1995). "CHARACTERIZATION OF THE NETWORK STRUCTURE OF DEXTRAN GLYCIDYL METHACRYLATE HYDROGELS BY STUDYING THE RHEOLOGICAL AND SWELLING BEHAVIOR." *Macromolecules* **28**(14): 5082-5088.
- DiCiccio, A. M. and G. W. Coates (2011). "Ring-Opening Copolymerization of Maleic Anhydride with Epoxides: A Chain-Growth Approach to Unsaturated Polyesters." *Journal of the American Chemical Society* **133**(28): 10724-10727.
- Dickinson, E. (2003). "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems." *Food Hydrocolloids* **17**(1): 25-39.
- Dickinson, E. (2009). "Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers." *Food Hydrocolloids* **23**(6): 1473-1482.
- Doshi, N. and S. Mitragotri (2009). "Designer Biomaterials for Nanomedicine." *Advanced Functional Materials* **19**(24): 3843-3854.
- Dressman, D., H. Yan, G. Traverso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2003). "Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(15): 8817-8822.
- E.L. Cussler (1997). "Diffusion, Mass Transfer in Fluids Systems, second ed." Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, .
- Ebewele, R. O. (1996). "Polymer Science and Technology " Boca Raton, New York. CRC Press LLC.: Cap. 10, 262-294.
- Fajardo, A. R., L. C. Lopes, A. G. B. Pereira, A. F. Rubira and E. C. Muniz (2012). "Polyelectrolyte complexes based on pectin-NH<sub>2</sub> and chondroitin sulfate." Carbohydrate Polymers **87**(3): 1950-1955.
- Francisco H. A. R et al, C. S., Antonio G. B. Pereira, Alessandro F. Martins, Andre R. Fajardo, Adley F. Rubira, Edvani C. Muniz (2013). "Superabsorbent Hydrogel Composites with a Focus on Hydrogels Containing Nanofibers or Nanowhiskers of Cellulose and Chitin." J. APPL. POLYM. SCI. 2013, DOI: 10.1002/APP.39725.
- Geng, Y., P. Dalhaimer, S. S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko and D. E. Discher (2007). "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery." Nature Nanotechnology **2**(4): 249-255.
- Girginova, P. I., A. L. Daniel-Da-Silva, C. B. Lopes, P. Figueira, M. Otero, V. S. Amaral, E. Pereira and T. Trindade (2010). "Silica coated magnetite particles for magnetic removal of Hg<sup>2+</sup> from water." Journal of Colloid and Interface Science **345**(2): 234-240.
- Gratton, S. E. A., P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier and J. M. DeSimone (2008). "The effect of particle design on cellular internalization pathways." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(33): 11613-11618.
- Guilherme, M. R., A. V. Reis, A. T. Paulino, T. A. Moia, L. H. C. Mattoso and E. B. Tambourgi (2010). "Pectin-Based Polymer Hydrogel as a Carrier for Release of Agricultural Nutrients and Removal of Heavy Metals from Wastewater." Journal of Applied Polymer Science **117**(6): 3146-3154.
- Gupta, P., K. Vermani and S. Garg (2002). "Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery." Drug Discovery Today **7**(10): 569-579.
- Gyergyek, S., D. Makovec, A. Mertelj, M. Huskic and M. Drofenik (2010). "Superparamagnetic nanocomposite particles synthesized using the mini-emulsion technique." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **366**(1-3): 113-119.
- Hamcerencu, M., J. Desbrieres, A. Khoukh, M. Popa and G. Riess (2008). "Synthesis and characterization of new unsaturated esters of Gellan Gum." Carbohydrate Polymers **71**(1): 92-100.
- Hamcerencu, M., J. Desbrieres, M. Popa, A. Khoukh and G. Riess (2007). "New unsaturated derivatives of Xanthan gum: Synthesis and characterization." Polymer **48**(7): 1921-1929.
- Hielscher, U. T. (2013). "Manual técnico,." disponível online em [http://www.hielscher.com/ultrasonics/sonochem\\_01.htm](http://www.hielscher.com/ultrasonics/sonochem_01.htm), consultado em 23/07/2013. .
- Hoare, T. R. and D. S. Kohane (2008). "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges." Polymer **49**(8): 1993-2007.
- Hoffman, A. S. (2002). "Hydrogels for biomedical applications." Advanced Drug Delivery Reviews **54**(1): 3-12.
- Hoffman, A. S. (2012). "Hydrogels for biomedical applications." Advanced Drug Delivery Reviews **64**: 18-23.
- Hong, J., C. K. Hong and S. E. Shim (2007). "Synthesis of polystyrene microspheres by dispersion polymerization using poly(vinyl alcohol) as a steric stabilizer in aqueous alcohol media." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **302**(1-3): 225-233.
- Huang, M. N., Y. L. Wang and Y. F. Luo (2010). "Synthesis, Characterization, and Biodegradation of Maleic Anhydride, Ethylene Glycol-Copolymerization Modified Poly(D,L-Lactide Acid) and Their Cross linked Products." Journal of Applied Polymer Science **118**(6): 3460-3470.
- Jaiswal, M. K., R. Banerjee, P. Pradhan and D. Bahadur (2010). "Thermal behavior of magnetically modalized poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan based nanohydrogel." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **81**(1): 185-194.
- Jordan, A., R. Scholz, P. Wust, H. Schirra, T. Schiestel, H. Schmidt and R. Felix (1999). "Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on

- human mammary carcinoma cells in vitro." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194**(1-3): 185-196.
- Karakus, G., A. F. Yenidunya, H. B. Zengin and Z. A. Polat (2011). "Modification of Maleic Anhydride-Styrene Copolymer with Noradrenaline by Chemical and Enzymatic Methods." *Journal of Applied Polymer Science* **122**(4): 2821-2828.
- Kim, N., E. D. Sudol, V. L. Dimonie and M. S. El-Aasser (2003). "Poly(vinyl alcohol) stabilization of acrylic emulsion polymers using the miniemulsion approach." *Macromolecules* **36**(15): 5573-5579.
- Kim, N., E. D. Sudol, V. L. Dimonie and M. S. El-Aasser (2004). "Comparison of conventional and miniemulsion copolymerizations of acrylic monomers using poly(vinyl alcohol) as the sole stabilizer." *Macromolecules* **37**(7): 2427-2433.
- Kim, O. K., K. Lee, K. Kim, B. H. Lee and S. Choe (2006). "Optimum conditions for preparing micron-sized PMMA beads in the dispersion polymerization using PVA." *Colloid and Polymer Science* **284**(8): 909-915.
- Kodama, R. H. (1999). "Magnetic nanoparticles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **200**(1-3): 359-372.
- Konwarh, R., J. P. Saikia, N. Karak and B. K. Konwar (2010). "'Poly(ethylene glycol)-magnetic nanoparticles-curcumin' trio: Directed morphogenesis and synergistic free-radical scavenging." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **81**(2): 578-586.
- Kost, J. and R. Langer (2012). "Responsive polymeric delivery systems." *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, *Supplement*(0): 327-341.
- Laurent, S., S. Dutz, U. O. Haefeli and M. Mahmoudi (2011). "Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles." *Advances in Colloid and Interface Science* **166**(1-2): 8-23.
- Leal, D., W. De Borggraeve, M. V. Encinas, B. Matsuhiro and R. Muller (2013). "Preparation and characterization of hydrogels based on homopolymeric fractions of sodium alginate and PNIPAAm." *Carbohydrate Polymers* **92**(1): 157-166.
- Lee, A., H. Y. Tsai and M. Z. Yates (2010). "Steric Stabilization of Thermally Responsive N-Isopropylacrylamide Particles by Poly(vinyl alcohol)." *Langmuir* **26**(23): 18055-18060.
- Lee, K. Y. and D. J. Mooney (2012). "Alginate: Properties and biomedical applications." *Progress in Polymer Science* **37**(1): 106-126.
- Leroux, J., V. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav and J. Mazoyer (2003). "Emulsion stabilizing properties of pectin." *Food Hydrocolloids* **17**(4): 455-462.
- Li L, Ahmed B, Mehta K and K. R. (2007). "Liposomal curcumin with and without oxaliplatin, effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer." *Mol Cancer Ther* **6**: 1276-1282.
- Lin, H. H. and Y. L. Cheng (2001). "In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) of varying architectures." *Macromolecules* **34**(11): 3710-3715.
- Liu, Q. (1988). "The Role of mineral surface composition and hydrophobicity in polysaccharide/mineral interactions." Tese de Doutorado, Department of Mining and Mineral Process Engineering, The University of British Columbia, The University of British Columbia, Vancouver.
- Liu, Z. H., Y. P. Jiao, Y. F. Wang, C. R. Zhou and Z. Y. Zhang (2008). "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems." *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**(15): 1650-1662.
- Lorenzo-Lamosa, M. L., C. Remunan-Lopez, J. L. Vila-Jato and M. J. Alonso (1998). "Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery." *Journal of Controlled Release* **52**(1-2): 109-118.
- Ma, Z. Y., Y. P. Guan and H. Z. Liu (2006). "Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **301**(2): 469-477.
- Mahmoudi, M., S. Sant, B. Wang, S. Laurent and T. Sen (2011). "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy." *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**(1-2): 24-46.

- Maior, J., A. V. Reis, E. C. Muniz and O. A. Cavalcanti (2008). "Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation." *International Journal of Pharmaceutics* **355**(1-2): 184-194.
- Mandal, A. S., N. Biswas, K. M. Karim, A. Guha, S. Chatterjee, M. Behera and K. Kuotsu (2010). "Drug delivery system based on chronobiology—A review." *Journal of Controlled Release* **147**(3): 314-325.
- Marczylo, T. H., R. D. Verschoyle, D. N. Cooke, P. Morazzoni, W. P. Steward and A. J. Gescher (2007). "Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **60**(2): 171-177.
- Martins, A. F., P. V. A. Bueno, E. A. M. S. Almeida, F. H. A. Rodrigues, A. F. Rubira and E. C. Muniz (2013). "Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release." *International Journal of Biological Macromolecules* **57**(0): 174-184.
- Mauricio, M. R., M. R. Guilherme, M. H. Kunita, E. C. Muniz and A. F. Rubira (2012). "Designing nanostructured microspheres with well-defined outlines by mixing carboxyl-functionalized amylose and magnetite via ultrasound." *Chemical Engineering Journal* **189**: 456-463.
- Medeiros, S. F., A. M. Santos, H. Fessi and A. Elaissari (2011). "Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications." *International Journal of Pharmaceutics* **403**(1-2): 139-161.
- Mishra, R. K., M. Datt, K. Pal and A. K. Banthia (2008). "Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system." *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **19**(6): 2275-2280.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter and J. C. Murray (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice." *Pharmacological Reviews* **53**(2): 283-318.
- Morris, G. A., Z. Hromadkova, A. Ebringerova, A. Malovikova, J. Alfoldi and S. E. Harding (2002). "Modification of pectin with UV-absorbing substituents and its effect on the structural and hydrodynamic properties of the water-soluble derivatives." *Carbohydrate Polymers* **48**(4): 351-359.
- Motornov, M., Y. Roiter, I. Tokarev and S. Minko (2010). "Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems." *Progress in Polymer Science* **35**(1-2): 174-211.
- Mukhiddinov, Z. K., D. K. Khalikov, F. T. Abdusamiev and C. C. Avloev (2000). "Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan." *Talanta* **53**(1): 171-176.
- Muro, S., C. Garnacho, J. A. Champion, J. Leferovich, C. Gajewski, E. H. Schuchman, S. Mitragotri and V. R. Muzykantov (2008). "Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers." *Molecular Therapy* **16**(8): 1450-1458.
- Nanjawade, B. K., F. V. Manvi and A. S. Manjappa (2007). "In situ.-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery." *Journal of Controlled Release* **122**(2): 119-134.
- Nie, S. M., Y. Xing, G. J. Kim and J. W. Simons (2007). Nanotechnology applications in cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **9**: 257-288.
- Ogonczyk, D., M. Siek and P. Garstecki (2011). "Microfluidic formulation of pectin microbeads for encapsulation and controlled release of nanoparticles." *Biomicrofluidics* **5**(1).
- Oh, J. K., R. Drumright, D. J. Siegwart and K. Matyjaszewski (2008). "The development of microgels/nanogels for drug delivery applications." *Progress in Polymer Science* **33**(4): 448-477.
- Oh, J. K., D. I. Lee and J. M. Park (2009). "Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications." *Progress in Polymer Science* **34**(12): 1261-1282.
- Oudshoorn, M. H. M., R. Rissmann, J. A. Bouwstra and W. E. Hennink (2007). "Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution." *Polymer* **48**(7): 1915-1920.
- Owens, D. E., Y. C. Jian, J. E. Fang, B. V. Slaughter, Y. H. Chen and N. A. Peppas (2007). "Thermally responsive swelling properties of polyacrylamide/poly(acrylic acid) interpenetrating polymer network nanoparticles." *Macromolecules* **40**(20): 7306-7310.
- Pang, S. C., S. F. Chin, S. H. Tay and F. M. Tchong (2011). "Starch-maleate-polyvinyl alcohol hydrogels with controllable swelling behaviors." *Carbohydrate Polymers* **84**(1): 424-429.



- Paulino, A. T., M. R. Guilherme, A. V. Reis, G. M. Campese, E. C. Muniz and J. Nozaki (2006). "Removal of methylene blue dye from an aqueous media using superabsorbent hydrogel supported on modified polysaccharide." *Journal of Colloid and Interface Science* **301**(1): 55-62.
- Pavia, D. L. (2010). *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: Parte 1-Componentes Básicos*. São Paulo, Cengage Learning.
- Peppas, N. A., P. Bures, W. Leobandung and H. Ichikawa (2000). "Hydrogels in pharmaceutical formulations." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**(1): 27-46.
- Peppas, N. A., J. Z. Hilt, A. Khademhosseini and R. Langer (2006). "Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology." *Advanced Materials* **18**(11): 1345-1360.
- Perera, G., J. Hombach and A. Bernkop-Schnurch (2010). "Hydrophobic Thiolation of Pectin with 4-Aminothiophenol: Synthesis and In Vitro Characterization." *Aaps Pharmscitech* **11**(1): 174-180.
- Petros, R. A. and J. M. DeSimone (2010). "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications." *Nature Reviews Drug Discovery* **9**(8): 615-627.
- Pietsch, C., U. Mansfeld, C. Guerrero-Sanchez, S. Hoepfener, A. Vollrath, M. Wagner, R. Hoogenboom, S. Saubern, S. H. Thang, C. R. Becer, J. Chiefari and U. S. Schubert (2012). "Thermo-Induced Self-Assembly of Responsive Poly(DMAEMA-*b*-DEGMA) Block Copolymers into Multi- and Unilamellar Vesicles." *Macromolecules* **45**(23): 9292-9302.
- Pollert, E., K. Knizek, M. Marysko, K. Zaveta, A. Lancok, J. Bohacek, D. Horak and M. Babic (2006). "Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing maghemite prepared by emulsion polymerization." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **306**(2): 241-247.
- Potorac, S., M. Popa, V. Maier, G. Lisa and L. Verestiuc (2012). "New hydrogels based on maleilated collagen with potential applications in tissue engineering." *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **32**(2): 236-243.
- Purushotham, S. and R. V. Ramanujan (2010). "Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy." *Acta Biomaterialia* **6**(2): 502-510.
- Qiu, Y. and K. Park (2012). "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**: 49-60.
- Racovita, S., S. Vasiliu, M. Popa and C. Luca (2009). "POLYSACCHARIDES BASED ON MICRO- AND NANOPARTICLES OBTAINED BY IONIC GELATION AND THEIR APPLICATIONS AS DRUG DELIVERY SYSTEMS." *Revue Roumaine De Chimie* **54**(9): 709-718.
- Rahman, M. M., M. M. Chehimi, H. Fessi and A. Elaissari (2011). "Highly temperature responsive core-shell magnetic particles: Synthesis, characterization and colloidal properties." *Journal of Colloid and Interface Science* **360**(2): 556-564.
- Reis, A. V., M. R. Guilherme, O. A. Cavalcanti, A. F. Rubira and E. C. Muniz (2006). "Synthesis and characterization of pH-responsive hydrogels based on chemically modified Arabic gum polysaccharide." *Polymer* **47**(6): 2023-2029.
- Reis, A. V., M. R. Guilherme, E. de Almeida, M. H. Kunita, E. C. Muniz, A. F. Rubira and E. B. Tambourgi (2011). "Copolymer Hydrogel Microspheres Consisting of Modified Sulfate Chondroitin-co-Poly(N-isopropylacrylamide)." *Journal of Applied Polymer Science* **121**(5): 2726-2733.
- Reis, A. V., M. R. Guilherme, T. A. Moia, L. H. C. Mattoso, E. C. Muniz and E. B. Tambourgi (2008). "Synthesis and characterization of a starch-modified hydrogel as potential carrier for drug delivery system." *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **46**(7): 2567-2574.
- Reis, A. V., M. R. Guilherme, A. F. Rubira and E. C. Muniz (2007). "Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks." *Journal of Colloid and Interface Science* **310**(1): 128-135.
- Rejinold, N. S., M. Muthunayanan, V. V. Divyarani, P. R. Sreerexha, K. P. Chennazhi, S. V. Nair, H. Tamura and R. Jayakumar (2011). "Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery." *Journal of Colloid and Interface Science* **360**(1): 39-51.
- Rejinold, N. S., P. R. Sreerexha, K. P. Chennazhi, S. V. Nair and R. Jayakumar (2011). "Biocompatible, biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) nanocarrier for curcumin drug delivery." *International Journal of Biological Macromolecules* **49**(2): 161-172.

- Rejman, J., V. Oberle, I. S. Zuhorn and D. Hoekstra (2004). "Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis." *Biochemical Journal* **377**: 159-169.
- Renard, C. and M. C. Jarvis (1999). "Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products." *Carbohydrate Polymers* **39**(3): 201-207.
- Ritger P. L., P. N. A. (1987). "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices." *Journal of Controlled Release* **5**: 37-42.
- Rosenbohm, C., I. Lundt, T. Christensen and N. W. G. Young (2003). "Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by H-1 NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties." *Carbohydrate Research* **338**(7): 637-649.
- Rubinstein, A., R. Radai, M. Ezra, S. Pathak and J. S. Rokem (1993). "INVITRO EVALUATION OF CALCIUM PECTINATE - A POTENTIAL COLON-SPECIFIC DRUG DELIVERY CARRIER." *Pharmaceutical Research* **10**(2): 258-263.
- Rzaev, Z. M. O., S. Dincer and E. Piskin (2007). "Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications." *Progress in Polymer Science* **32**(5): 534-595.
- S. FARRELL, R. H. (2002). "AN INTRODUCTION TO DRUG DELIVERY FOR CHEMICAL ENGINEERS." *Chemical Engineering Education*.
- Sahiner, N., W. T. Godbey, G. L. McPherson and V. T. John (2006). "Microgel, nanogel and hydrogel-hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: synthesis and characterization." *Colloid and Polymer Science* **284**(10): 1121-1129.
- Satarkar, N. S., D. Biswal and J. Z. Hilt (2010). "Hydrogel nanocomposites: a review of applications as remote controlled biomaterials." *Soft Matter* **6**(11): 2364-2371.
- SCHETTINO, M. A. J. (2009). "Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro." TESE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA.
- Schild, H. G. (1992). "POLY (N-ISOPROPYLACRYLAMIDE) - EXPERIMENT, THEORY AND APPLICATION." *Progress in Polymer Science* **17**(2): 163-249.
- Schipper, M. L., G. Iyer, A. L. Koh, Z. Cheng, Y. Ebenstein, A. Aharoni, S. Keren, L. A. Bentolila, J. Q. Li, J. H. Rao, X. Y. Chen, U. Banin, A. M. Wu, R. Sinclair, S. Weiss and S. S. Gambhir (2009). "Particle Size, Surface Coating, and PEGylation Influence the Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice." *Small* **5**(1): 126-134.
- Schuetz, Y. B., R. Gurny and O. Jordan (2008). "A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68**(1): 19-25.
- Sharma, R. and M. Ahuja (2011). "Thiolated pectin: Synthesis, characterization and evaluation as a mucoadhesive polymer." *Carbohydrate Polymers* **85**(3): 658-663.
- Shi, W., S. Dolai, S. Rizk, A. Hussain, H. Tariq, S. Averick, W. L'Amoreaux, A. El Ldrissi, P. Banerjee and K. Raja (2007). "Synthesis of monofunctional curcumin derivatives, clicked curcumin dimer, and a PAMAM dendrimer curcumin conjugate for therapeutic applications." *Organic Letters* **9**(26): 5461-5464.
- Siew, C. K. and P. A. Williams (2008). "Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(11): 4164-4171.
- Sinha, V. R. and R. Kumria (2001). "Polysaccharides in colon-specific drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics* **224**(1-2): 19-38.
- Sinitsya, A., J. Copikova, V. Prutyaynov, S. Skoblya and V. Machovic (2000). "Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines." *Carbohydrate Polymers* **42**(4): 359-368.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd (1990). "NEW COLORIMETRIC CYTOTOXICITY ASSAY FOR ANTICANCER-DRUG SCREENING." *Journal of the National Cancer Institute* **82**(13): 1107-1112.
- Souto-Maior, J. F. A., A. V. Reis, L. N. Pedreiro and O. A. Cavalcanti (2010). "Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization." *Polymer International* **59**(1): 127-135.

- Synsytysya, A., J. Copikova, P. Matejka and V. Machovic (2003). "Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins." *Carbohydrate Polymers* **54**(1): 97-106.
- Tamaki, Y., T. Konishi, M. Fukuta and M. Tako (2008). "Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*." *Food Chemistry* **107**(1): 352-361.
- Tamaro, L., U. Costantino, A. Bolognese, G. Sammartino, G. Marenzi, A. Calignano, S. Tete, F. Mastrangelo, L. Califano and V. Vittoria (2007). "Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications." *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**(4): 417-423.
- Tang, H. D., C. J. Murphy, B. Zhang, Y. Q. Shen, E. A. Van Kirk, W. J. Murdoch and M. Radosz (2010). "Curcumin polymers as anticancer conjugates." *Biomaterials* **31**(27): 7139-7149.
- Tay, S. H., S. C. Pang and S. F. Chin (2012). "Facile synthesis of starch-maleate monoesters from native sago starch." *Carbohydrate Polymers* **88**(4): 1195-1200.
- Thammawong, C., P. Sreearunothai, A. Petchsuk, P. Tangboriboonrat, N. Pimpha and P. Opaprakasit (2012). "Preparation and characterizations of naproxen-loaded magnetic nanoparticles coated with PLA-g-chitosan copolymer." *Journal of Nanoparticle Research* **14**(8).
- Van Vlierberghe, S., P. Dubruel and E. Schacht (2011). "Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review." *Biomacromolecules* **12**(5): 1387-1408.
- Vandijkwolthuis, W. N. E., O. Franssen, H. Talsma, M. J. Vansteenbergen, J. J. K. Vandenbosch and W. E. Hennink (1995). "SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND POLYMERIZATION OF GLYCIDYL METHACRYLATE DERIVATIZED DEXTRAN." *Macromolecules* **28**(18): 6317-6322.
- Vervoort, L., G. Van den Mooter, P. Augustijns, R. Bousson, S. Toppet and R. Kinget (1997). "Inulin hydrogels as carriers for colonic drug targeting: I. Synthesis and characterization of methacrylated inulin and hydrogen formation." *Pharmaceutical Research* **14**(12): 1730-1737.
- Wei, H., S. X. Cheng, X. Z. Zhang and R. X. Zhuo (2009). "Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers." *Progress in Polymer Science* **34**(9): 893-910.
- Wichterle, O. L., D. (1960). "Hydrophilic gels for biological use." *Nature* **185**: 117-118.
- Winning, H., N. Viereck, L. Norgaard, J. Larsen and S. B. Engelsen (2007). "Quantification of the degree of blockiness in pectins using H-1 NMR spectroscopy and chemometrics." *Food Hydrocolloids* **21**(2): 256-266.
- Woerly, S., S. Fort, I. Pignot-Paintrand, C. Cottet, C. Carcenac and M. Savasta (2008). "Development of a sialic acid-containing hydrogel of poly N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide : Characterization and implantation study." *Biomacromolecules* **9**(9): 2329-2337.
- Working, P. K. and A. D. Dayan (1996). "Pharmacological-toxicological expert report - Caelyx(TM) - (Stealth(R) liposomal doxorubicin HCl) - Foreword." *Human & Experimental Toxicology* **15**(9): 751-785.
- Yallapu, M. M., M. Jaggi and S. C. Chauhan (2012). "Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer." *Drug Discovery Today* **17**(1-2): 71-80.
- Yao, M. J., F. Mai, H. Deng, N. Y. Ning, K. Wang and Q. A. Fu (2011). "Improved Thermal Stability and Mechanical Properties of Poly(propylene carbonate) by Reactive Blending with Maleic Anhydride." *Journal of Applied Polymer Science* **120**(6): 3565-3573.
- Yoo, J. W., N. Doshi and S. Mitragotri (2010). "Endocytosis and Intracellular Distribution of PLGA Particles in Endothelial Cells: Effect of Particle Geometry." *Macromolecular Rapid Communications* **31**(2): 142-148.
- Zhang, X. Z., D. Q. Wu and C. C. Chu (2004). "Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN-PNIPAAm hydrogels." *Biomaterials* **25**(17): 3793-3805.
- Zhang, Y., H. F. Chan and K. W. Leong (2013). "Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future." *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**(1): 104-120.
- Zrinyi, M., L. Barsi and A. Buki (1996). "Deformation of ferrogels induced by nonuniform magnetic fields." *Journal of Chemical Physics* **104**(21): 8750-8756.