



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Andrés Felipe Chamorro Rengifo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA PIRAZOLINA H3TM04 CONTRA
CÂNCER DE PELE E LEUCEMIA INCORPORADA EM NANOPARTÍCULAS DE
HEXANOIL CARBOXIMETIL QUITOSANA (N_{PS}CHQ) E NANOFIBRAS DE
PEO/QUITOSANA CONTENDO N_{PS}CHQ

Florianópolis

2019

Andrés Felipe Chamorro Rengifo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA PIRAZOLINA H3TM04 CONTRA CÂNCER DE PELE E LEUCEMIA INCORPORADA EM NANOPARTÍCULAS DE HEXANOIL CARBOXIMETIL QUITOSANA (N_{PS}CHQ) E NANOFIBRAS DE PEO/QUITOSANA CONTENDO N_{PS}CHQ

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Edson Minatti

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Luiz Parize.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chamorro Rengifo, Andrés Felipe

Avaliação do potencial citotóxico da pirazolina H3TM04
contra câncer de pele e leucemia incorporada em
nanopartículas de hexanoil carboximetil quitosana (NpsCHQ)
e nanofibras de PEO/quitosana contendo NpsCHQ / Andrés
Felipe Chamorro Rengifo ; orientador, Edson Minatti,
coorientador, Alexandre Luis Parize, 2019.

135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Câncer de pele. . 3. Liberação controlada.
. 4. Nanofibras/Nanopartículas. . 5. Quitosana. . I.
Minatti, Edson . II. Parize, Alexandre Luis. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Química. IV. Título.

Andrés Felipe Chamorro Rengifo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA PIRAZOLINA H3TM04 CONTRA CÂNCER DE PELE E LEUCEMIA INCORPORADA EM NANOPARTÍCULAS DE HEXANOIL CARBOXIMETIL QUITOSANA (N_{PS}CHQ) E NANOFIBRAS DE PEO/QUITOSANA CONTENDO N_{PS}CHQ

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. André Ricardo Fajardo
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr(a). Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Thiago Ferreira da Conceição
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em química.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Edson Minatti
Orientador(a)

Florianópolis, 17 de Julho de 2019.

Dedicado aos meus queridos irmãos (Juliana, David, Carlos, Sebastian e Janeth) e aos meus pais (Carlos e Martha).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Química pela infraestrutura para desenvolver o projeto e meu Doutorado.

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e apoio financeiro;

Aos professores Edson Minatti e Alexandre Luiz Parize pela orientação, discussões teóricas, amizade e apoio durante o doutorado.

Aos Doutores Vania R. de Lima, Sandra C. Santos, Alvaro Javier Patiño. Agudelo, Luis Henrique Mendes da Silva, Cassiana Mendes, Débora Fretes Argenta, Marta Elisa Rosso Dotto, Thiago Caon, Maria Cláudia Santos da Silva, Ricardo José Nunes pelas discussões teóricas, e apoio teórico e experimental durante o desenvolvimento de este projeto.

Aos mestres Natalia Marcéli Stefanos, Vanderlei Luis Sitta Severgnini, Juliana Dreyer e Adalberto Enumo Junior por seu apoio e aporte experimental durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC), Centro Tecnológico-Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA-UFSC) e Central de Análises do Departamento de Química pelo suporte técnico.

Aos professores André Ricardo Fajardo, Elenara Maria Teixeira Lemos Senna e Thiago Ferreira da Conceição por participar na banca e seus aportes.

Integrantes do Grupo Polissol, grupo polimat pelo apoio e amizade.

RESUMO

Recentes avanços no desenvolvimento de nanomateriais, permitiram sua aplicação na liberação controlada de fármacos para o tratamento local contra o câncer. Porém, apesar dos inúmeros sistemas reportados nesta área, a baixa taxa de acumulação dos nanomateriais no sistema biológico, continua sendo um desafio. Nanopartículas (Nps) poliméricas homogeneamente distribuídas em nanofibras poliméricas (Nfs) formadas por eletrospinning, são uma alternativa para superar estes desafios. Assim, nesta Tese de doutorado desenvolveu-se um novo nanomaterial pela dispersão de Nps de carboximetil hexanoil quitosana/dodecil sulfato (CHQ-SDS) em nanofibras de PEO/quitosana (PEOCh-H3). O nanomaterial foi aplicado na liberação controlada da pirazolina (H3TM04) com atividade contra leucemia e câncer de pele (melanoma). A tese foi desenvolvida em 3 etapas: i) Um estudo fundamental, para compreender o processo de interação e formação dos nanoagregados CHQ-SDS. ii) Formação de Nps de CHQ-SDS, aplicadas na encapsulação e liberação *in vitro* do H3TM04 em células leucêmicas. iii) A formação de PEOCh-H3 por eletrospinner, aplicado na liberação *in vitro* e *ex vivo* do H3TM04 em células de melanoma e pele humana, respectivamente. A formação dos nanoagregados de CHQ-SDS acontece por auto-montagem hidrofóbica entre as duas espécies, sendo um processo termodinamicamente favorável. Por outro lado, a presença de SDS diminui o raio hidrodinâmico e a carga superficial dos nanoagregados, incrementando a estabilidade coloidal em solução aquosa por um período de até 150 dias. As Nps de CHQ-SDS com morfologia esférica foram formadas em pH 7,4 e caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia de transmissão eletrônica (MET) e potencial zeta. A eficiência de encapsulação do H3TM04 foi de 96% com raio hidrodinâmico médio de $83,9 \pm 1,2$ nm. Os resultados de liberação *in vitro* demonstraram que o processo de liberação do composto ativo acontece pela erosão do nanoparticulado, diminuindo a concentração inibitória 50% para células de leucemia (Jukat e K-562). Finalmente, as Nfs PEOCh-H3 foram formadas e caracterizadas por análises térmicas e microscópicas. As Nps foram evidenciadas dentro das Nfs por TEM. Estudos *in vitro* demonstraram que o processo de liberação do H3TM04 acontece pela difusão e erosão do nanomaterial durante 120 h. Por outro lado, o nanoparticulado na Nfs incrementou a acumulação do composto ativo na epidermes (ensaio de liberação *ex vivo* em pele humana), como também, incrementou em 50% o efeito citotóxico do H3TM04 frente células de melanoma. Sendo assim, esta dupla barreira de liberação (Nfs/Nps) é um promissor candidato na liberação controlada de fármacos, para incrementar a taxa de acumulação do composto ativo e do nanomaterial no sistema biológico.

Palavras-chave: Câncer de pele. Eletrospinning. Leucemia. liberação controlada. Nanofibras. Nanopartículas. quitosana.

ABSTRACT

Recent advances in the development of nanomaterials have allowed their application in the controlled release of drugs for local treatment against cancer. However, despite the numerous systems reported in this area, the accumulation low rate of the nanomaterials in the biological systems remains a challenge. Polymeric nanoparticles (Nps) homogeneously distributed in polymer nanofibers (Nfs) formed by eletrospinning are an alternative to overcome these challenges. Thus, in this doctoral theses, a new nanomaterial was developed by dispersion of the Nps of carboxymethyl hexanoyl chitosan/dodecyl sulfate (CHQ-SDS) in PEO/chitosan Nfs (PEOCh-H3). The nanomaterial was applied in the controlled release of pyrazoline (H3TM04), which have activity against leukemia and melanoma cancer cells. The thesis was developed in 3 stages: i) A fundamental study, to understand the interaction process and nanoaggregates formation of the carboxymethyl hexanoyl chitosan / dodecyl sulfate. ii) Formation of CHQ-SDS Nps applied in the encapsulation and *in vitro* assays against leukemic cells. iii) The formation of the Nfs PEOCh-H3 by eletrospinning, and applied *in vitro* and *ex vivo* release of H3TM04 in melanoma cells and human skin. The formation of CHQ-SDS nanoaggregates occurs by hydrophobic assembly between the SDS and CHQ, where this is a thermodynamically favorable process. On the other hand, the presence of SDS decreases the hydrodynamic radius and surface charge of the nanoaggregates, increasing the colloidal stability in aqueous solution for up to 150 days. The CHQ-SDS Nps were formed at pH 7.4 and characterized by dynamic light scattering, electron transmission microscopy and zeta potential, showed a spherical morphology. The encapsulation efficiency of H3TM04 was 96% and the nanoparticles had $83,9 \pm 1,2$ nm of the hydrodynamic radius. The *in vitro* release results demonstrated that the active compound release process occurs by the Nps erosion, decreasing the inhibitory concentration (IC50) for leukemia cells (Jukat and K-562). Finally, the PEOCh-H3 nanofibers were formed and characterized by thermal and microscopic techniques. The Nps were evidenced within the Nfs by transmission electron microscopy. *in vitro* studies demonstrated that the release process of H3TM04 occurs by diffusion and erosion of the nanomaterial during 120 h. On the other hand, PEOCh-H3 increases the accumulation of the active compounds in the epidermis (*ex vivo* release test on human skin), as well as increases the cytotoxic effect of H3TM04 in melanoma cells (*in vitro* test). This double release barrier (Nfs/Nps) is a promising candidate for the controlled release of drugs to increases the accumulation rate of the active compound in the biological tissue.

Keywords: Skin cancer; Electrospinning; Leukemia; Controlled release; Nanofibers, Nanoparticles; Chitosan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do ciclo celular.	24
Figura 2. Estrutura molecular de: a) Colchicina, b) Chalconas, c) Pirazolinas.....	25
Figura 3. Síntese da pirazolina H3TM04 a partir de 3',4',5'-trimetoxichalconas.	26
Figura 4. Nanoestruturas utilizadas como carreadores de fármacos. a) Lipossoma, b) Nanocápsula, c) Nanoesferas.	28
Figura 5. Modelo de internalização de Nps contendo fármaco.....	29
Figura 6. Comparação de variações de concentração de fármacos por terapia convencional (Linhas verde e laranja) e liberação controlada (linha azul).	30
Figura 7. Perfis de liberação de fármacos: i) Quadrados abertos, pico e fase rápida II, ii) Círculos cheios, liberação trifásica com fase curta II, iii) Cruzamentos, pico e liberação de ordem zero, iv) Diamantes cheios, liberação trifásica, v) Traços, liberação bifásica sem relaxação <i>burst</i>	31
Figura 8. Mecanismos de liberação de fármacos: A) Difusão através dos poros cheios de água, B) difusão através da matriz polimérica, C) Pressão osmótica, e D) Erosão.	33
Figura 9. Mecanismo de liberação de fármacos de matrizes hidrofílicas que intumescem e sofrem erosão: a) Matriz no estado seco, b) início da hidratação e intumescimento da interface, c) incremento da hidratação, d) Intumescimento da matriz, início da erosão das cadeias poliméricas, e) separação de cadeias poliméricas com liberação rápida do fármaco interno. .	34
Figura 10. Estrutura química da quitosana.	35
Figura 11. Modificações químicas das unidades glucosamina da quitosana: a) Metilação, b) Tiolação, =c) Acilação, d) Co-polimerização, e) N-succinilação.....	36
Figura 12. Rota sintética das carboximetil quitosana.	37
Figura 13. Reação de formação da N-alkil quitosana.....	39
Figura 14. Formação de Nps pela da autoassociação de CHQ. a) unimeros de CHQ em solução, b) associação dos unimeros de CHQ para formar as Nps, c) Nps de CHQ.....	40
Figura 15. Interação de surfactante com a membrana celular, a) Em ausência de etil(hidroxietil) celulose, b) Em presença de etil(hidroxietil) celulose.	42
Figura 16. Estrutura molecular do dodecilsulfato de sódio.	42
Figura 17. Variação da intensidade de espalhamento e função de autocorrelação para suspensões de diferente tamanho de partícula.	45

Figura 18. Variação da frequência de relaxação (Γ) em função do quadrado do vetor de espalhamento (q^2) para particulado com diferente R_H	47
Figura 19. Calorímetro de titulação isotérmica (ITC).....	48
Figura 20. Variação da potência no tempo de um termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC).	48
Figura 21. a) Ilustração do eletrospinner, b) Cone de Taylor.....	50
Figura 22. Ilustração da produção de nanofibras com nanopartículas adsorbidas na interface.	52
Figura 23. Nanofibras de acetato de polivinila/quitosana com nanopartículas de prata.	53
Figura 24. Imagens de SEM de Nfs de policaprolactona com nanopartículas de quitosana/focoidan.....	53
Figura 25. A) Estrutura química do PEO. b) Nanofibras de PEO com Nps de celulose.....	54
Figura 26. Etapas do projeto de doutorado.....	56
Figura 27. Proposta da rota sintética da hexanoil carboximetil quitosana (CHQ).	58
Figura 28. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da (a) quitosana; (b) carboximetil quitosana e (c) carboximetil hexanoil quitosana.	71
Figura 29. Espectros de RMN 1H (400 MHz) a 80 °C da (a) quitosana; (b) carboximetil quitosana e (c) carboximetil hexanoil quitosana. Os espectros b e c foram obtidos por supressão de solvente.	72
Figura 30. a) Isoterma de adsorção de CHQ em tampão fosfato pH 7,4 a 298,15 K. (b) Distribuição da função de tamanho $A(R_H)$ dos agregados de CHQ em diferentes concentrações ($0,05 \text{ mg mL}^{-1} - 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) e ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K. A distribuição rápida e lenta é atribuída aos unímeros e agregados de CHQ, respectivamente.	74
Figura 31. Isoterma de adsorção de SDS (escala logarítmica) em (■) tampão pH 7,4 e (□) CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão pH 7,4. As concentrações de agregação são marcadas com linhas verticais e as linhas vermelhas correspondem aos ajustes sigmoide e linear.	76
Figura 32. Curvas de condutividade (escala relativa) em solução aquosa de SDS em (a) tampão pH 7,4 (■) CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (□). (b) diferentes concentrações ($0 - 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) de CHQ em tampão pH 7,4 a 298,15 K. As transições de agregação são marcadas com linhas verticais e as linhas vermelhas correspondem aos ajustes lineares.....	78
Figura 33. (a) Razão I_1/I_3 das bandas de emissão de fluorescência do pireno versus o Log_{10} da concentração de SDS em tampão pH 7,4 (●) e CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (○); (b) Curvas de titulação calorimétrica da adição de 19 mmol L^{-1} de SDS em tampão fosfato pH 7,4 (○) e CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (Δ) a 298,15 K; (c) Variação da entalpia molar aparente em função da concentração de	

SDS. A ΔH_{ap-int} foi obtida da subtração da curva de diluição de SDS da curva de titulação de SDS na solução de CHQ. As linhas servem apenas como guia visual.	81
Figura 34. Efeito da concentração de SDS sobre; (a) Função de autocorrelação de DLS $g^{(1)}_{(q,t)}$, (b) Função de distribuição de tempo de decaimento $A(\tau)$, (c) Função de distribuição de tamanho $A(R_H)$ dos agregados de SDS-CHQ em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K. d) raio hidrodinâmico real (\bullet) e potencial Zeta ζ (\square) dos agregados de SDS-CHQ. As linhas sólidas servem apenas como guia visual.	84
Figura 35. Efeito do tempo no raio hidrodinâmico aparente R_H^{agg} das CHQ-SDS em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ a 298,15 K com diferentes concentrações de SDS (0 – 6 mmol L ⁻¹). As linhas servem apenas como guia visual.	85
Figura 36. (1) Função de autocorrelação $g^{(1)}_{(q,t)}$ e (2) função de distribuição de tempo de decaimento $A(t)$ obtida pelo método CONTIN no ângulo de espalhamento de 90° a 298,15 K para (a) CHQ-SDS e (b) CHQ-SDS-H em tampão fosfato pH 7,4. Nas duas amostras, o modo lento representa o 98% da população.	87
Figura 37. Função de distribuição de tamanho $A(R_H)$ no ângulo de espalhamento de 90° a 298,15 K para (\bullet) CHQ-SDS e (\circ) CHQ-SDS-H. No interior do gráfico mostra-se os R_H de cada distribuição.	88
Figura 38. Função de autocorrelação $g^{(1)}_{(q,t)}$ e dependência da taxa de relaxação em função do vetor de espalhamento q^2 para (a,c) CHQ-SDS e (b,d) CHQ-SDS-H para diferentes ângulos de espalhamento (variando de 30° até 140°) em tampão fosfato pH 7,4 e 298,15 K. Nas figuras a e b, de (i) para (x) corresponde aos ângulos de espalhamento 140° , 120° , 100° , 80° , 60° e 40°	89
Figura 39. (a) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas CHQ-SDS, utilizando como contraste acetato de urânio. O <i>inset</i> em (a) mostra uma nanopartícula com morfologia esférica. (b) Distribuição de tamanho de CHQ-SDS com diâmetro meio de $70,1 \pm 2,3$ nm.	90
Figura 40. Efeito do tempo de armazenamento sobre o raio hidrodinâmico das nanopartículas de (\bullet) CHQ-SDS e (\circ) CHQ-SDS-H em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K. As linhas sólidas servem apenas como guia visual.	91
Figura 41. (a) Espectros de emissão de fluorescência do H3TM04 em acetonitrila (os espectros de (i) para (x) correspondem a 0,04 para 0,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H3TM04). (b) Curva de calibração de H3TM04 em acetonitrila. A linha vermelha corresponde ao ajuste linear.	92

Figura 42. (a) Espectros de emissão de fluorescência de H3TM04 em diferentes proporções água-dioxano (os espectros de (i) para (x) correspondem à porcentagem de dioxano (v/v) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90). (b) Comprimento de onda máximo da emissão de fluorescência do H3TM04 versus a energia de transição $E_T(30)$ do H3TM04 em diferentes proporções de água-dioxano (10 a 90% de dioxano). A linha vermelha corresponde ao ajuste linear.	93
Figura 43. Perfil de liberação <i>in vitro</i> de H3TM04 de (●) CHQ-SDS e (●) H3TM04 livre em tampão pH 7,4 com dodecil sulfato de sódio a 0,5% (m/v) para atingir as condições <i>Sink</i> . Os resultados são mostrados como a média \pm DP de pontos em triplicata e as linhas as linhas sólidas servem apenas como guia visual.	94
Figura 44. Citotoxicidade dos agregados de CHQ (Agg CHQ), nanopartículas de CHQ-SDS e SDS frente a linha celular de leucemia Jurkat por 24 h. Os resultados são a média \pm DP de pelo menos 4 experimentos independentes. * $p \geq 0,05$ em comparação aos grupos controle, usando um ANOVA, seguido do teste post-hoc de Bonferroni.....	97
Figura 45. Citotoxicidade de H3TM04 encapsulado nas nanopartículas de CHQ-SDS frente dois tipos de linha celular de leucemia: a) Jurkat, (b) K-562 (c) B16F10. Os resultados são a média \pm DP de pelo menos 4 experimentos independentes. * $p \geq 0,05$; ** $p \geq 0,01$; *** $p \geq 0,001$ em comparação aos grupos controle, usando um ANOVA, seguido do teste post-hoc de Bonferroni.....	98
Figura 46. Detecção do apoptose em células K-562 e Jurkat utilizando o ensaio de marcação com laranja de acridina / brometo de etídio.	100
Figura 47. Morfologia e distribuição de diâmetro das nanofibras de PEOCh, PEOCh-H3 e PEOChNp. Imagens de FEG-SEM (a) PEOCh, (b) PEOCh-H3, (c) PEOChNp. (d-f): Distribuição de tamanho correspondente das nanofibras (a)-(c). (g-i): Imagens de AFM correspondentes (área escaneada: 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) das (a)-(c).	103
Figura 48. Imagens de TEM das nanofibras de (a) PEOCh, (b) PEOCh-H3, (c) PEOChNp. Dentro de cada imagem de TEM encontra-se o ângulo de contato da água com o nanomaterial correspondente. (d): distribuição de diâmetro da nanopartículas de CHQ-SDS-H dentro das nanofibras de PEOChNp.	105
Figura 49. Caracterização de H3TM04 (azul), quitosana pura (vermelho), PEO puro, nanofibras de PEOCh (verde), PEOCh-H3 (cinza) e PEOChNp (rosa) por: a) Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), b) Análise termogravimétrica e c) Calorimetria diferencial de varredura (DSC).	106
Figura 50. Perfil de liberação <i>in vitro</i> de H3TM04 em (●) nanofibras PEOCh-H3 e (●) nanofibras PEOChNp em tampão fosfato pH 7,4 com 0,5% (m/v) de SDS para atingir as	

condições *Sink*. Os resultados são apresentados como o valor médio \pm DP de 3 experimentos independentes, as linhas solidas apenas servem como guia visual..... 108

Figura 51. a) Retenção de H3TM04 em pele humana, liberado das nanopartículas de CHQ-SDS-H depois de 7 h de ensaio de permeação. Indicando a diferença estatística ($p < 0,05$). b) imagens de microscopia de fluorescência de H3TM04 em pele humana (20 μm) depois de 7 h de tratamento; i) controle, ii) H3TM04, iii) Nps CHQ-SDS-H, iv) PEOChH3 e v) PEOChNps. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos e de agregação da interação CHQ-SDS em tampão pH 7,4 a 298,15 K.....	80
Tabela 2. Parâmetros cinéticos da liberação de H3TM04 de nanopartículas de CHQ-SDS em tampão pH 7,4 com dodecil sulfato de sódio a 0,5% (m/v).....	96
Tabela 3. Valores de IC ₅₀ para H3TM04 livre e encapsulado nas Nps de CHQ-SDS frente às células K-562 e Jurkat, com tempos de incubação de 24, 48 e 72 h.....	99
Tabela 4. Parâmetros de liberação do H3TM04 nas Nfs de PEOCh-H3 e PEOChNp.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica, do inglês Atomic force microscopy
agg	Agregados
$A(\tau)$	Função de distribuição do tempo de decaimento
$A(R_H)$	Função de distribuição do tamanho
cac	Concentração de agregação crítica
CHQ	Carboximetil hexanoil quitosana
CHQ-SDS	Nps de carboximetil-hexanoil-quitosana/SDS
CHQ-SDS-H	Nps de carboximetil-hexanoil-quitosana/SDS contendo H3TM04
cmc	Concentração micelar crítica
CMQ	Carboximetil quitosana
C_{SDS}	Concentração molar de SDS
D	Coefficiente de difusão
D_o	Coefficiente de difusão a diluição infinita
DLS	Espalhamento de luz Dinâmico, do inglês Dynamic light scattering
DOX	Doxorrubicina
DSC	Calorimetria diferencial de varredura, do inglês Differential scanning calorimetry
DS	Grau de substituição do grupo hexanoil
DP	Desvio padrão
F	Fração total de carboximetilação
$ET_{(30)}$	Energias de transição da escala de polaridade de Reichardt
FEG-SEM	Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo, do inglês Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês Fourier transform infrared spectroscopy.
$g^{(1)}_{(q,t)}$	Função de autocorrelação de DLS
H	Entalpia
I_1	Intensidade de fluorescência do pireno obtido em 372,5 nm
I_3	Intensidade de fluorescência do pireno obtido em 383,5 nm
IC50	Concentração inibitória 50%
$I(t)$	Intensidade espalhada no tempo t
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica, do inglês Isothermal titration calorimetry
H3TM04	1-(5-naftaleno-2-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona
k	Constante de Boltzmann
K_D	Coefficiente virial hidrodinâmico
n	Índice de refração do solvente
Nf	Nanofibra
Nfs	Nanofibras
N_p	Nanopartícula
N_{ps}	Nanopartículas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
M_w	Massa molar média ponderal
M_t/M_∞	Fração de H3TM04 liberada no tempo (t)
PBS	Tampão fosfato-salino (pH 7,4), do inglês phosphate buffered saline

P_{ext}	Pressão externa
PEO	Poli(óxido de etileno)
PEOCh	Nanofibras de PEO e quitosana
PEOCh-H	Nanofibras de PEO e quitosana contendo H3TM04
PEOChNp	Nanofibras de PEO e quitosana contendo CHQ-SDS-H
psp	Ponto de saturação do polímero
q	Vetor de espalhamento
q	Calor
RMN 1H	Ressonância Magnética nuclear de prótons
R_H	Raio hidrodinâmico
R_H^{agg}	Raio hidrodinâmico dos agregados
$R_H^{agg}_{real}$	Raio hidrodinâmico real dos agregados
R_H^{Np}	raio hidrodinâmico das nanopartículas
$R_H^{Np}_{real}$	raio hidrodinâmico das nanopartículas
R_H^{uni}	Raio hidrodinâmico dos unímeros de CHQ
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate
SLS	Espalhamento de luz estático, do inglês Static Light Scattering
SPECs	Complexos polieletrólito – surfactante, do inglês surfactant polyelectrolyte complexes
T	Temperatura absoluta
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês Transmission electron microscopy
TGA	Análise termogravimétrica, do inglês Thermogravimetric analysis
U	Energia interna do sistema
V	Volume
W	Trabalho
% DA	Grau de acetilação da quitosana
% EE_{Nps}	Porcentagem de eficiência de encapsulação do H3TM04 nas Nps
% EE_{Nfs}	Porcentagem de eficiência de encapsulação das nanofibras
α	Grau de ionização
γ	Tensão superficial
Γ	Frequência de relaxação
ΔG_{cac}^o	Varição da energia livre Gibbs padrão da associação CHQ-SDS
ΔG_{psp}^o	Varição da energia livre Gibbs padrão da formação de micelas de SDS em presença de CHQ
$\Delta \Delta G_{agg}^o$	Varição da energia livre Gibbs padrão da adsorção das micelas de SDS na macromolécula de CHQ
ΔH_{ap-int}	Entalpia molar aparente de interação
ΔH_{agg}	Entalpia integral para formar os agregados de SDS-CHQ
$\Delta_{pro}H$	Varição de entalpia em um processo termodinâmico em condições de pressão constante
ΔH_{obs}	Entalpia molar observada
ζ	Potencial zeta
η	Viscosidade do solvente
θ	Ângulo de espalhamento
κ	Condutividade específica
λ	Comprimento de onda
λ_{EM}^{Max}	Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência
τ	Tempo de decaimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	21
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1.1 O câncer	22
1.1.2 Nanocarreadores de fármacos	26
1.1.3 Perfis <i>in vitro</i> de liberação de fármacos carregados em Nps	29
1.1.4 Mecanismos clássicos de liberação de fármacos	32
1.1.4.1 Difusão	32
1.1.4.2 Pressão osmótica	32
1.1.4.3 Erosão	33
1.1.5 Liberação de fármacos de polímeros hidrofílicos	33
1.1.6 Quitosana	34
1.1.7 Derivados de quitosana	36
1.1.8 N-alkil-carboximetil quitosana	38
1.1.9 Surfactantes	41
1.1.10 Comportamento de um surfactante em solução aquosa	42
1.1.11 Interação entre polissacarídeos-surfactantes	43
1.1.12 Técnicas utilizadas para o estudo da interação macromolécula – surfactante ...	44
1.1.12.1 Espalhamento de luz	44
1.1.12.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	47
1.1.13 Nanofibras	50
1.1.13.1 Aplicação de nanofibras na medicina	51
1.2 OBJETIVOS	55
1.2.1 Objetivos específicos	55
1.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	56
1.3.1 Reagentes	57

1.3.2	Formação de nanoagregados de CHQ-SDS in solução aquosa.	57
1.3.2.1	Síntese de CMQ	57
1.3.2.2	Obtenção de CHQ	58
1.3.2.3	Medidas de tensão superficial	60
1.3.2.4	Medidas de condutividade	60
1.3.2.5	Medidas de Fluorescência.....	60
1.3.2.6	Medidas de DLS e potencial zeta	61
1.3.2.7	Medidas de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	61
1.3.3	Nanopartículas de carboximetil-hexanoil quitosana / dodecil sulfato de sódio ..	62
1.3.3.1	Formação e caracterização das Nps de CHQ-SDS.....	62
1.3.3.2	Eficiência de encapsulação	62
1.3.3.3	Localização do H3TM04 nas nanopartículas.....	63
1.3.3.4	Perfil e cinética de liberação <i>in vitro</i> do H3TM04.....	63
1.3.3.5	Ensaio da atividade antitumoral	64
1.3.3.5.1	Cultura celular de células leucêmicas	64
1.3.3.5.2	Ensaio de viabilidade (MTT) e avaliação morfológica do apoptose.....	65
1.3.4	Nanofibras de PEO-quitosana contendo nanopartículas de carboximetil-hexanoil quitosana/dodecil sulfato carreando a pirazolina H3TM04 para câncer de pele.....	65
1.3.4.1	Produção de nanofibras	65
1.3.4.2	Morfologia das nanofibras.....	66
1.3.4.3	Caracterização das nanofibras.....	66
1.3.4.4	Eficiência de encapsulação de H3TM04 nas nanofibras.....	67
1.3.4.5	Perfil e cinética de liberação <i>in vitro</i> do H3TM04 das nanofibras.....	67
1.3.4.6	Ensaio de permeação em pele humana	68
1.3.4.6.1	Preparação das amostras de pele humana	68
1.3.4.6.2	Experimentos com células de difusão por fluxo.....	68
1.3.4.6.3	Análise de permeação em pele por microscopia de fluorescência.....	68

1.3.4.7	Cultura celular de melanoma e ensaio de viabilidade celular	69
	CAPÍTULO II	70
2	FORMAÇÃO DE NANOAGREGADOS DE CARBOXIMETIL HEXANOIL QUITOSANA / DODECIL SULFATO DE SÓDIO EM SOLUÇÃO AQUOSA	70
2.1	Caracterização de quitosana, carboximetil quitosana e carboximetil hexanoil quitosana.....	71
2.2	Formação dos agregados de CHQ	73
2.3	Interação da carboximetil hexanoil quitosana com dodecil sulfato de sódio.	76
2.4	Raio hidrodinâmico e estabilidade dos agregados de SDS-CHQ em solução aquosa.....	83
	CAPÍTULO III	86
3	NANOPARTÍCULAS DE CARBOXIMETIL-HEXANOIL QUITOSANA/ DODECIL SULFATO DE SÓDIO: EFICIENTE NANOCARREADOR DA PIRAZOLINA H3TM04 COM ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA	86
3.1	Caracterização das nanopartículas.....	87
3.2	Eficiência de encapsulação (% EE_{Nps})	91
3.1	Localização do H3TM04 nas nanopartículas.....	92
3.2	Liberação de H3TM04 - estudo <i>in vitro</i>	93
3.3	Efeito citotóxico das nanopartículas de CHQ-SDS com H3TM04 frente às linhas celulares de leucemia	96
	CAPÍTULO IV	102
4	NANOFIBRAS DE PEO-QUITOSANA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE CARBOXIMETIL HEXANOIL QUITOSANA/DODECIL SULFATO CONTENDO A PIRAZOLINA H3TM04	102
4.1	Morfologia de nanofibras formadas.	103
4.2	Eficiência de encapsulação (% $EENfs$) e estudo de liberação <i>in vitro</i> do H3TM04.....	107
4.3	Estudo de permeação de pele humana <i>ex vivo</i>	110
	CAPÍTULO V	112
5	CONCLUSÕES GERAIS	112

6	REFERÊNCIAS	114
	ANEXO A.....	124
	ANEXO B.....	125
	ANEXO C.....	130
	ANEXO D.....	132

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A nanomedicina é um campo de pesquisa interdisciplinar que engloba várias áreas da ciência como química, medicina, farmácia, física, biologia e engenharias, e baseia-se na criação e aplicação médica de materiais em escala nanométricas (CHEN et al., 2016). Atualmente, a liberação controlada de fármacos na quimioterapia local é um dos campos de maior desafio na ciência dos nanomateriais. Materiais desenvolvidos neste campo, devem apresentar características tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, e propriedades físico-químicas e biológicas conhecidas (CHEN et al., 2016; MOLINA et al., 2015).

Nanopartículas (Nps) e nanofibras (Nfs) poliméricas na faixa de 10 – 500 nm, como carreadora de fármacos, tem sido desenvolvido com vista à melhora da solubilidade, estabilidade, biocompatibilidade, perfil de liberação, apresentando também propriedades físico-químicas adequadas para garantir sucesso na entrega do fármaco na região tumoral (CHEN et al., 2016). Porém, na interação do nanomaterial–sistema biológico, diversos desafios precisam ser atingidos. Como: via de ação, taxa de permanência e acumulação do fármaco no sistema tumoral, e taxa de transferência do composto ativo, são de vital interesse. Nanopartículas (Nps) homogeneamente distribuídas em matrizes poliméricas como nanofibras poliméricas, são consideradas uma alternativa para superar estes desafios.

Quitosana, por exemplo, é um polissacarídeo utilizado no preparo de Nps e apresenta uma estrutura química modificável, o que possibilita melhorar importantes propriedades físico-químicas das Nps, como solubilidade em água, seletividade bioquímica e incrementar sua bio-aplicação. Além disso, este material mascara propriedades organolépticas dos fármacos (como gosto, odor e cor) facilitando sua ingestão (VIJAY KUMAR THAKUR AND MANJU KUMAR THAKUR, 2014). Nos últimos 20 anos, um progresso notável na síntese e aplicação de Nps de quitosana na encapsulação e liberação controlada de fármacos antitumorais for observado, com o propósito de aumentar a eficiência e reduzir os efeitos colaterais em comparação aos métodos convencionais como a quimioterapia. Porém, estes sistemas

apresentam múltiplos obstáculos, principalmente, instabilidade físico-química, limitando os processos de endocitose e liberação controlada do fármaco na célula alvo (JEE et al., 2012).

Em vista disso, o trabalho desenvolvido nesta Tese de doutorado visa obter novos nanodispositivos capaz de melhorar o efeito citotóxico da pirazolina H3TM04 frente câncer de pele e leucemia. Primeiramente, será realizado um estudo fundamental da interação de dodecilsulfato de sódio (SDS) com carboximetil-hexanoil-quitosana (CHQ). O SDS é um surfactante modelo amplamente utilizado na literatura, já que se conhecem suas propriedades físico-químicas e comportamento em solução aquosa. O estudo de interação permitirá modular as propriedades físico-químicas e o controle das nanoestruturas formadas. Para assim, avaliar o potencial científico e tecnológico associado este sistema. Como também procura-se aplicar estas nanoestruturas na encapsulação e liberação *in vitro* da pirazolina H3TM04 com atividade contra leucemia e câncer de pele.

As nanopartículas de CHQ e SDS formadas, serão utilizadas para formar um novo nanodispositivo de liberação controlada pela dispersão de este sistema coloidal contendo o composto ativo em nanofibras de Poli(óxido de etileno) (PEO)/quitosana por eletrospinning, visualizando a formação de um novo nanomaterial com possível aplicação na liberação controlada do H3TM04 para o tratamento do câncer de pele humana. Com o propósito de fornecer uma base teórica do trabalho, a seguir será exposta uma revisão da literatura abordando alguns tópicos essenciais como características do câncer, a quitosana e a interação polissacarídeos – surfactantes.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 O câncer

O câncer é um grupo de doenças caracterizado pela multiplicação descontrolada de células do organismo. As células afetadas perdem o controle do mecanismo da reprodução celular, o qual normalmente é causado por uma alteração do material biológico (DNA) (BANDGAR et al., 2010). Este grupo de doenças é uma problemática para a população mundial. No ano 2016 causou aproximadamente 600,000 mortes só nos Estados Unidos (BANDGAR et al., 2010). Por outro lado, de acordo com a mais recente revisão estatística da Organização Mundial da Saúde (OMS) no documento World Câncer Report 2014, espera-se para o ano 2025, mais de 20 milhões de novos casos de câncer no mundo, onde 80% (16

milhões) acontecerão em países em desenvolvimento (STEWART, BERNARD W, WILD, 2014). No Brasil, O Instituto Nacional Câncer do Brasil (INCA) reportou que para o biênio 2016 – 2017 aconteceram cerca de 600 mil novos casos de câncer, destes 180 mil casos são de câncer de pele (STEWART, BERNARD W, WILD, 2014).

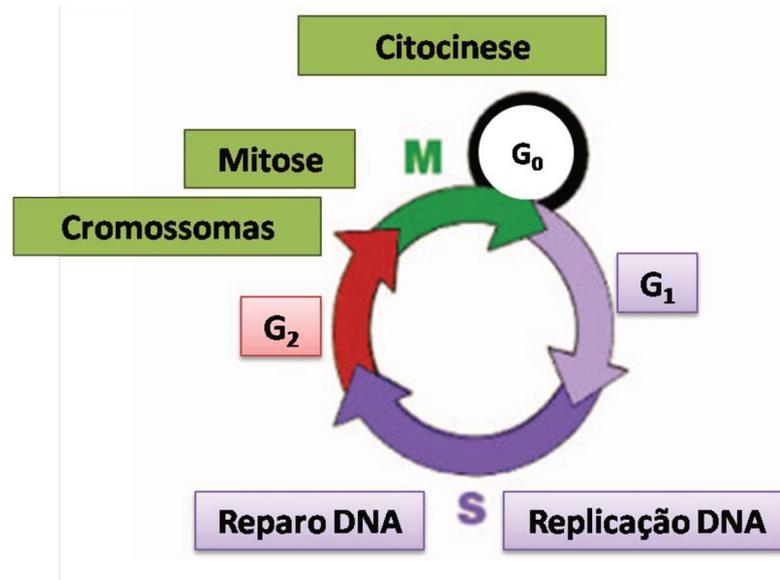
O câncer é classificado de acordo com a origem e formação da célula tumoral primária, havendo cinco tipos de câncer: i) Carcinoma, origina-se na pele ou em tecidos que cobrem os órgãos internos. ii) Sarcoma, origina-se na gordura, músculo, ossos e cartilagens. iii) Leucemia, inicia-se nos tecidos de formação do sangue como a medula óssea. iv) Linfoma, origina-se no sistema imune. E por último, v) Sistema nervoso, origina-se nos tecidos cerebrais e a medula espinhal (ALTEI, 2014).

O crescimento das células cancerígenas leva à formação de tecidos tumorais. Estes podem ser classificados em tumores benignos que se desenvolvem em uma região sem invadir outros tecidos, ou malignos, quando as células são capazes de migrar para outros tecidos promovendo a formação de tumores secundários, sendo este processo de migração é denominado metástase (ALTEI, 2014).

Os tratamentos utilizados para o câncer normalmente baseia-se na cirurgia, radioterapia e na quimioterapia (uso de fármacos). A quimioterapia baseia-se na destruição das células tumorais, no entanto, a maioria dos fármacos não são seletivos a células tumorais, afetando também o funcionamento das células saudáveis o que leva à problemas de toxicidade (SHIN et al., 2016).

A Figura 1 mostra as diferentes etapas do ciclo celular. Este inicia com a fase G₁, onde há um aumento do tamanho da célula para replicar o ácido desoxirribonucleico (DNA) na síntese S. Logo, na etapa G₂ a célula se prepara para a mitose (M) obtendo novas células (filhas), as quais passam a repetir o ciclo celular. Os danos que alteram o mecanismo celular são detectados e reparados pelos DNA. No entanto, em células cancerígenas não há eficiência nos mecanismos de auto-reparação provocando anormalidade do ciclo celular (DE ALMEIDA et al., 2005).

Figura 1. Etapas do ciclo celular.



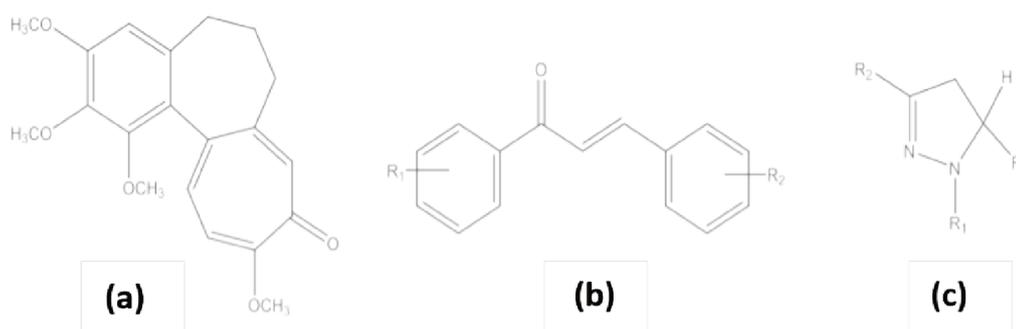
Fonte: Adaptada da literatura (DE ALMEIDA et al., 2005).

Em todas as células do corpo humano existem duas proteínas esféricas similares, a α e β tubulinas, com massa molar de aproximadamente 50 kDa. Estas proteínas formam $\alpha - \beta$ heterodímeros, seguido de um processo de polimerização na célula para formar microtúbulos, os quais têm uma ativa participação no processo de mitose. A participação dos microtúbulos acontece na primeira etapa da mitose, na prófase, onde ocorre a condensação dos cromossomas e a desintegração do nucléolo, seguido da formação do fuso mitótico do citoesqueleto. Os cromossomas que antes encontravam-se sem orientação, unem-se ao fuso mitótico e grupam-se na região central da célula. Portanto, agentes que interferem na dinâmica da tubulina podem agir como inibidores da divisão celular. Estes tipos de compostos ativos são denominados agentes antimicrotubulares (JORDAN et al., 1998).

Jordan et al., classificaram os agentes antimicrotubulares pelo sítio de ligação nas α e β tubilinas: i) sítio de ligação colchicina, ii) sítio de ligação do alcalóide vinca; iii) sítio de ligação rizoxina / maitansina; iv) sítio de ligação da sulfidril na tubulina; e v) sítios de ligação desconhecidos. Este documento focará em descrever os compostos do sítio de ligação colchicina (JORDAN et al., 1998). O nome deste grupo é derivado da colchicina (Figura 2a), o qual foi o primeiro fármaco antimitótico estudado e caracteriza-se pela presença do grupo 3,4,5-trimetoxifenila em sua estrutura. Este é um alcalóide e clássico agente antimicrotubular que liga-se na tubulina e atualmente é utilizado no tratamento da gota. A colchicina provoca mudanças conformacionais na estrutura secundária da α -tubulina, inibindo o processo de

polimerização. Além disso, por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio promove a desnaturação parcial da β -tubulina impedindo a formação dos microtúbulos. Porém, a colchicina apresenta alta toxicidade e logo, tem-se feito um esforço científico para encontrar homólogos que não apresentem esse problema, como chalconas e pirazolininas (FINKELSTEIN et al., 2010).

Figura 2. Estrutura molecular de: a) Colchicina, b) Chalconas, c) Pirazolininas.



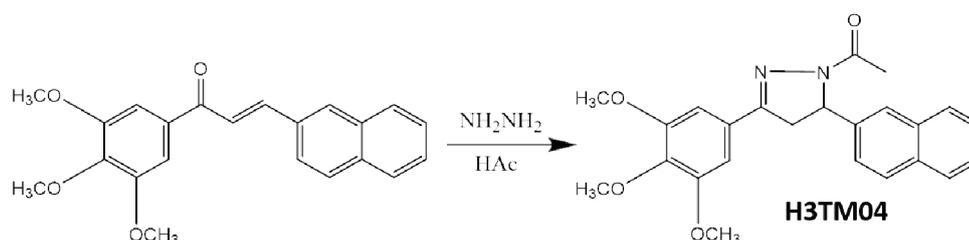
Fonte: *O autor.*

As chalconas são cetonas α,β -insaturadas onde tanto a carbonila quanto a porção oleofínica estão ligadas à grupos aromáticos (Figura 2b). Estes são derivados dos flavonóides e são caracterizadas por apresentar uma ampla aplicação biológica, especialmente como agentes antimicrotubulares (JORDAN et al., 1998). Chalconas 2,5-dimetoxifenila e 3',4',5'-trimetoxichalconas são descritas como potentes agentes citotóxicos frente ao câncer de pele e leucemia (BANDGAR et al., 2010; ORLIKOVA et al., 2011). Além disso, estudos sob tumor animal mostram que as chalconas podem ser até 300 vezes mais potentes em impedir a reprodução celular que a colchicina (JORDAN et al., 1998).

Por outro lado, as pirazolininas são heterocíclicos não aromáticos pertencentes à família 1,2-azóis. Sua estrutura é formada por dois átomos de nitrogênio adjacentes e três átomos de carbono (Figura 2c). Esta família de compostos caracteriza-se por ter ampla atividade biológica como antitumoral, antimicrobiana anti-inflamatório, antioxidante e propriedades anticancerígenas (SHAABAN; MAYHOUB; FARAG, 2012; SHIN et al., 2016). Baseados nos conceitos descritos, o grupo de pesquisa Laboratório de Síntese e Estrutura-Atividade (LSEA) dirigido pelo professor Dr. Ricardo José Nunes realizou a síntese de pirazolininas a partir de chalconas com grupos 3',4',5'-trimetoxichalconas por adição 1,4 de Michael (Figura 3), com o

objetivo de obter novos compostos com atividade anticancerígena, os quais teriam as propriedades de agente antimicrotubulares das chalconas e as propriedades biológicas das pirazolininas. De acordo aos ensaios citotóxicos *in vitro* frente células de leucemia e de pele humana, a pirazolina H3TM04 (Figura 3) apresentou o maior potencial citotóxico da série de pirazolininas sintetizada pelo LSEA (STEFANES et al., 2019), e por este motivo foi utilizada neste trabalho.

Figura 3. Síntese da pirazolina H3TM04 a partir de 3',4',5'-trimetoxichalconas.



Fonte: *O autor.*

No entanto, no tratamento contra o câncer, a efetividade de muitos fármacos utilizados na quimioterapia é limitada por sua capacidade de atingir o sítio de ação terapêutica (JORDAN et al., 1998; ORLIKOVA et al., 2011). Na maioria das situações apenas uma pequena dose do fármaco administrado atinge o sítio de ação e o restante do fármaco é distribuído no organismo de acordo com suas propriedades físico-químicas. Isto requer a utilização de altas doses dos fármacos que consequentemente incrementa o nível de toxicidade do agente antitumoral (RAMASAMY et al., 2017). Nos últimos anos, a nanotecnologia tem-se focado em desenvolver Nps como carreadores de fármacos para otimizar o subministro e superar os principais inconvenientes do tratamento contra o câncer.

1.1.2 Nanocarreadores de fármacos

Na atualidade não existe uma estrita definição de Nps, principalmente porque existem diferentes organizações desenvolvendo pesquisas com nanotecnologia e não há total consenso nas definições propostas. Por exemplo, a *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* define Nps como material que se encontra na faixa de tamanhos de 1 - 1000 nm (SWARBRICK, 2018). Esta definição é respaldada pela comunidade europeia, entretanto, o documento *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR)* as Nps são divididas em três categorias: i) categoria 1, com tamanho maiores de 500 nm, ii) categoria 2, com

tamanhos entre 500 - 100 nm, e iii) categoria 3, Nps menores de 100 nm. No entanto, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define Nps como material com dimensões menores de 100 nm. Nesta escala, estes materiais são difíceis de produzir, mas apresentam propriedades diferentes ao material em estado macroscópico.

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a nanomedicina surgiu como nova ferramenta, gerando um estágio de novas aplicações na medicina. O transporte e liberação de fármacos de forma específica e controlada é o campo de maior desenvolvimento. Na atualidade, foca-se em desenvolver aplicações utilizando nanomateriais por vias não invasivas (oral, nasal, ocular e tópica) (ZHANG et al., 2016).

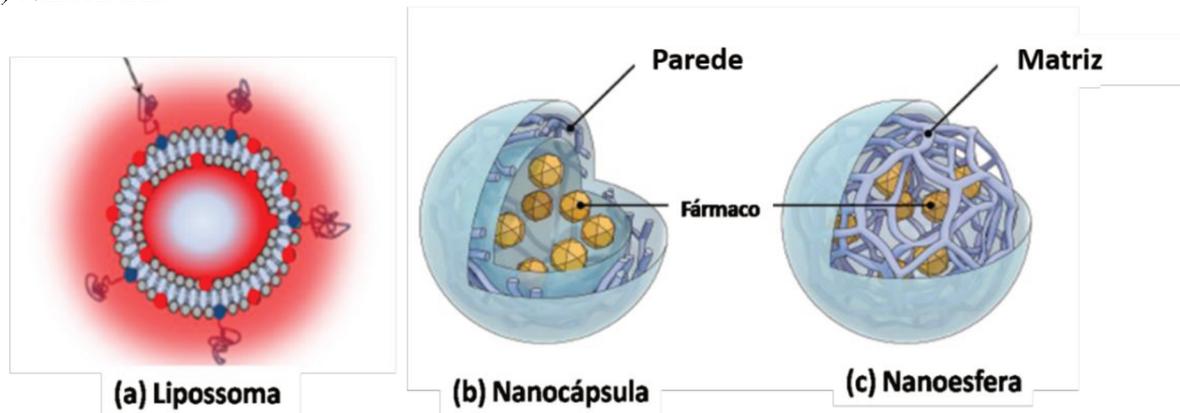
Dentre os carreadores mais estudados para o transporte de fármacos, encontram-se os lipossomas e as Nps poliméricas. Os lipossomas (formado pela auto-agregação de fosfolipídios) apresentam algumas limitações como baixa estabilidade, difícil reprodução de tamanho e baixa eficácia de encapsulação do fármaco (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010; RAMASAMY et al., 2017). Por outro lado, as Nps poliméricas possuem maior estabilidade e reprodutibilidade de tamanho, quando comparadas com os lipossomas.

Existem dois tipos básicos de Nps poliméricas: as nanoesferas e as nanocápsulas (Figura 4). As primeiras apresentam uma estrutura matricial e a encapsulação do fármaco acontece pela sua adsorção sobre a superfície e/ou dispersão na matriz polimérica (Figura 4). As nanocápsulas possuem uma parede polimérica e um interior oco ou um núcleo oleoso, permitindo assim encapsular o fármaco no núcleo ou na parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). Porém testes *in vitro* de Nps em células cancerosas têm demonstrado que não há um sistema ideal de Nps, visto que o processo de liberação do fármaco dentro da célula alvo depende de muitos fatores e/ou características que afetam a interação célula – Np (CHO et al., 2008; MU et al., 2016).

A membrana plasmática é a interface da célula e através da qual a célula se comunica com o exterior. Por conseguinte, qualquer material extracelular que deseje ingressar na célula deve interagir com os componentes lipídicos e protéicos da membrana plasmática (SANPUI; CHATTOPADHYAY; GHOSH, 2011). Nps contendo fármacos podem acessar o citoplasma da célula sendo internalizadas pela mesma (endocitose) ou causando danos na parede celular e posteriormente a morte da célula. A endocitose é o mecanismo de comunicação da célula que envolve internalização de conteúdos extracelulares, pela encapsulação dentro de vesículas

(agregados (agg) de fosfolipídios revestidos por proteínas) que podem chegar em tamanhos entre 200 – 600 nm (UNFRIED et al., 2007).

Figura 4. Nanoestruturas utilizadas como carreadores de fármacos. a) Lipossoma, b) Nanocápsula, c) Nanoesferas.

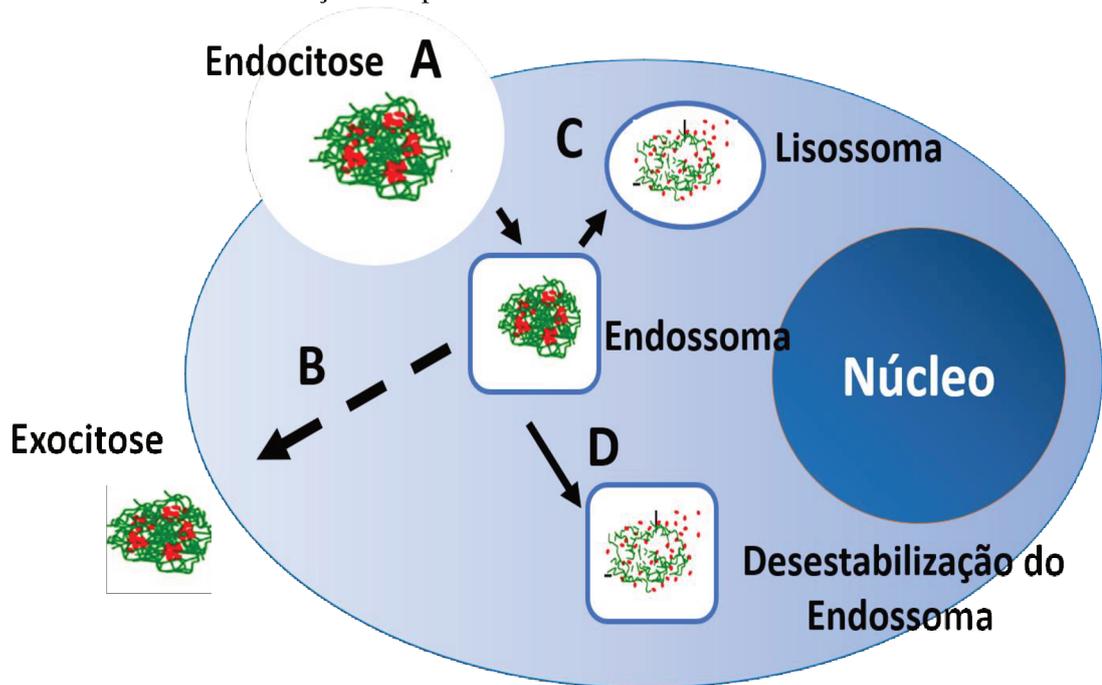


Estudos de interação de Nps poliméricas com células cancerosas têm demonstrado que o processo de liberação do fármaco na célula acontece em várias etapas (Figura 5): A) A Np é internalizada no endossoma (vesícula formada pelos componentes da parede celular) via interação não específica ou específica com um receptor. Quando a Np está dentro da célula podem acontecer três mecanismos: B) parte das Nps podem ser recusadas pela célula num processo de exocitose. C) As Nps podem ser transferidas para os lisossomos, onde enzimas lisossômicas podem degradar o fármaco perdendo sua atividade ou entregá-lo no núcleo da célula. No entanto, este mecanismo ainda é pouco conhecido. Por último, D) Os endossomas e/ou a Nps podem ser desestabilizados causando a liberação do fármaco no núcleo, citosol ou mitocôndrias (PARK et al., 2006; RAMASAMY et al., 2017).

A desestabilização de Nps poliméricas e do endossoma normalmente acontece por mudanças de pH, ultrassom ou irradiação de luz (RAMASAMY et al., 2017; ZHANG et al., 2016) Alguns Nps de polissacarídeos são desestabilizados pela mudança de pH, devido ao fato que os endossomas das células cancerosas apresentam pH mais baixos (entre 4 – 5) que endossomas de células saudáveis (pH \approx 6), pela acumulação de ácido lático. Isto causa a expansão das Nps e posterior liberação do fármaco. Contudo, o processo de interação com a célula é dependente das características das Nps como; tamanho, carga superficial, composição da partícula, etc (HARDIANSYAH et al., 2015; NABEREZHNYKH et al., 2013). Por exemplo, em tumores sólidos Nps entre 10 - 200 nm de diâmetro tem maior facilidade de internalizar em células tumorais. Como também, podem-se acumular em alta concentração na região tumoral

por longo tempo devido ao fenômeno EPR (do inglês, Enhanced permeability and retention effect), que é supressão da filtração linfática. Contrariamente, agregados menores que 5 nm são facilmente eliminados da circulação sanguínea pela depuração renal (MU et al., 2016; RAMASAMY et al., 2017; UNFRIED et al., 2007).

Figura 5. Modelo de internalização de Nps contendo fármaco.



Fonte: Adaptada da literatura (PARK et al., 2006).

A formação de Nps na faixa de 10 - 200 nm com polímeros insolúveis em água normalmente implicam a utilização de um ou vários solventes orgânicos, transferência de calor e elevada força de cisalhamento. Além disso, algumas metodologias contêm etapas como polimerização em emulsão e evaporação de solvente, demandando energia (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010). No entanto, polímeros solúveis em água permitem o uso de metodologias simples, com poucas etapas e amigáveis com o meio ambiente, evitando a utilização de solventes orgânicos e alta transferência de energia ao sistema.

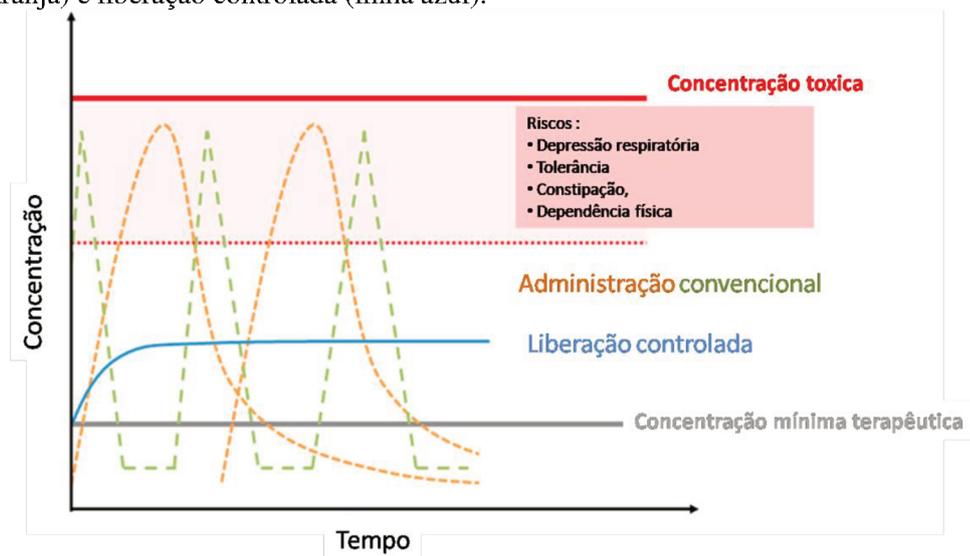
1.1.3 Perfis *in vitro* de liberação de fármacos carregados em Nps

Em terapias convencionais, a concentração plasmática do fármaco no meio de liberação aumenta até atingir um valor máximo de dissolução e posteriormente diminui, sendo

necessária uma nova administração. Assim, concentrações maiores do que a faixa terapêutica podem provocar efeitos colaterais no paciente, e concentrações menores que a faixa terapêutica podem ser ineficazes no tratamento (Figura 6).

No entanto, dispositivos de liberação controlada, entre esses os sistemas nanoestruturados permitem ter uma liberação controlada na faixa terapêutica por tempo prolongado utilizando uma única administração. Além disso, estes sistemas, permitem: i) Maior controle na liberação do fármaco, ii) Reduz os intervalos de administração e diminui a toxicidade provocada pelo excesso de fármaco, iii) Promove altas concentrações no sítio de ação em comparação com os métodos convencionais e iv) Direcionamento do princípio ativo a alvos específicos e proteção do fármaco do microambiente (UHRICH et al., 1999).

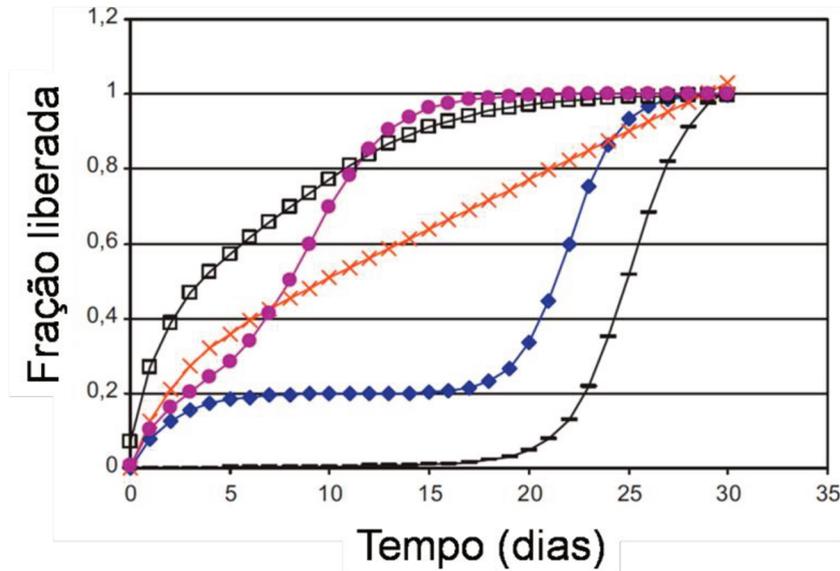
Figura 6. Comparação de variações de concentração de fármacos por terapia convencional (Linhas verde e laranja) e liberação controlada (linha azul).



Fonte: Adaptada da literatura (MARTIN et al., 2016).

Além da liberação de ordem zero, embora o preferido numa liberação controlada (Figura 6, linha azul), há sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos pulsáteis, sendo que, a liberação do fármaco mais comum em sistemas poliméricos com degradação heterogênea é um perfil trifásico ou bifásico, especialmente para sistemas polidispersos (KAMALY et al., 2016). A Figura 7 mostra diferentes perfis trifásicos reportados na literatura para a liberação controlada de fármacos por Nps.

Figura 7. Perfis de liberação de fármacos: i) Quadrados abertos, pico e fase rápida II, ii) Círculos cheios, liberação trifásica com fase curta II, iii) Cruzamentos, pico e liberação de ordem zero, iv) Diamantes cheios, liberação trifásica, v) Traços, liberação bifásica sem relaxação *burst*.



Fonte: Adaptada da literatura (KAMALY et al., 2016).

Em um sistema de liberação trifásico, a etapa I, conhecida como efeito de liberação "*burst*" e faz referência à liberação rápida do fármaco que se encontra próximo da interface polímero – água. A liberação "*burst*" pode acontecer por diversas causas, tais como: 1) Condições de armazenamento, onde o fármaco pode difundir para a superfície da Np, 2) Formação lenta do gel em hidrogéis polimérico, permitindo o vazamento do fármaco, 3) Matrizes poliméricas heterogêneas, 4) Baixa capacidade de difusão do fármaco na matriz polimérica, 5) Defeitos de fabricação, 6) Difusão e migração do fármaco durante a fabricação do nanoagregado. No entanto, a liberação "*burst*" pode ser favorável, em tratamentos que seja necessária uma liberação rápida do fármaco, como liberação no sangue, e para tratamentos que necessitam de uma liberação pulsátil (KAMALY et al., 2016).

A etapa II, é governada por uma liberação lenta do fármaco. Este processo pode acontecer por difusão através da matriz polimérica, degradação da forma farmacêutica e da interface da Np. Por último a etapa III, é a fase mais rápida da liberação e acontece normalmente por erosão das Nps, da interface ou da matriz polimérica promovendo uma rápida liberação do fármaco. O perfil que apresente o processo de liberação depende de um grande número de características específicas de cada sistema.

1.1.4 Mecanismos clássicos de liberação de fármacos

A liberação do fármaco faz referência a como acontece o transporte e transferência da molécula ativa desde sua posição inicial (matriz polimérica) até a superfície do nanoagregado, e posteriormente como ocorre a entrega ao microambiente alvo. Em sistemas poliméricos, as moléculas de fármaco podem ser liberadas principalmente por: i) Difusão, ii) Pressão osmótica e iii) Erosão. Estes mecanismos serão brevemente discutidos a seguir.

1.1.4.1 Difusão

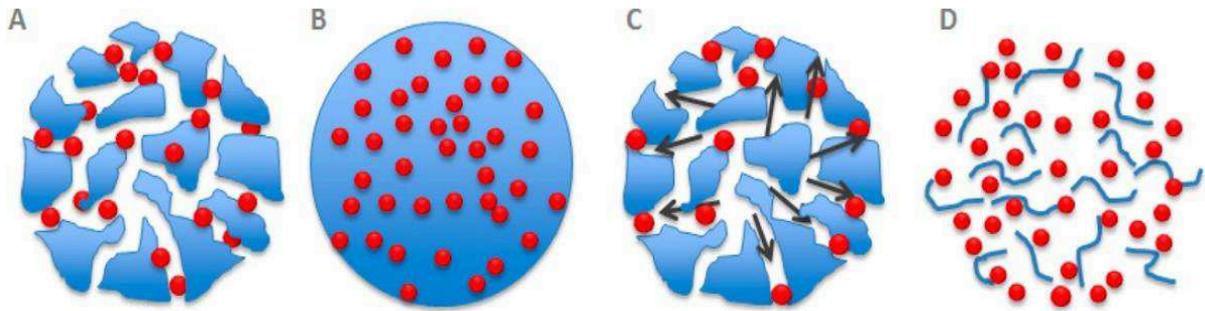
Este é o movimento aleatório das moléculas do fármaco impulsionado por um gradiente de potencial químico, o qual é próximo do gradiente de concentração. Em sistemas poliméricos degradáveis, a água é absorvida pelos poros do nanocarreador, incrementando seu tamanho no tempo e favorecendo a liberação através dos poros (Figura 8a). A taxa de liberação do fármaco é controlada pela difusão através dos poros, e posteriormente acontece a degradação da matriz polimérica aumentando a taxa de liberação. Por outro lado, a difusão do fármaco também pode acontecer pela matriz polimérica (Figura 8b), onde a taxa de liberação é constante e não é afetada pelos gradientes de concentração, no entanto o processo depende fortemente das características da parede polimérica do nanomaterial como a permeabilidade e a espessura (KAMALY et al., 2016).

1.1.4.2 Pressão osmótica

A osmose pode ser definida como a movimentação espontânea de um solvente através de uma membrana seletiva permeável promovida por uma diferença de pressão na membrana, conhecida como pressão osmótica. Isto é, que o processo é dirigido por uma diferença de potencial químico de um soluto através da membrana, permitindo a passagem do solvente, mas impede a passagem dos outros solutos presentes no sistema. Utilizando um nanoagregado revestido de uma membrana semipermeável e com um ou mais pontos de liberação, é possível efetuar a osmose para a liberação controlada de fármacos. Quando o nanoagregado absorve água, este se expande em volume, empurrando a solução ou o fármaco para fora do nanocarreador pelos pontos de liberação (Figura 8c). A taxa de liberação por pressão osmótica é independente do pH, mas é dependente da taxa na qual acontece a adsorção da água, da

permeabilidade da membrana de revestimento e da pressão gerada pelos componentes principais da formulação (RAMPINO et al., 2013).

Figura 8. Mecanismos de liberação de fármacos: A) Difusão através dos poros cheios de água, B) difusão através da matriz polimérica, C) Pressão osmótica, e D) Erosão.



Fonte: Adaptada da literatura (KAMALY et al., 2016).

1.1.4.3 Erosão

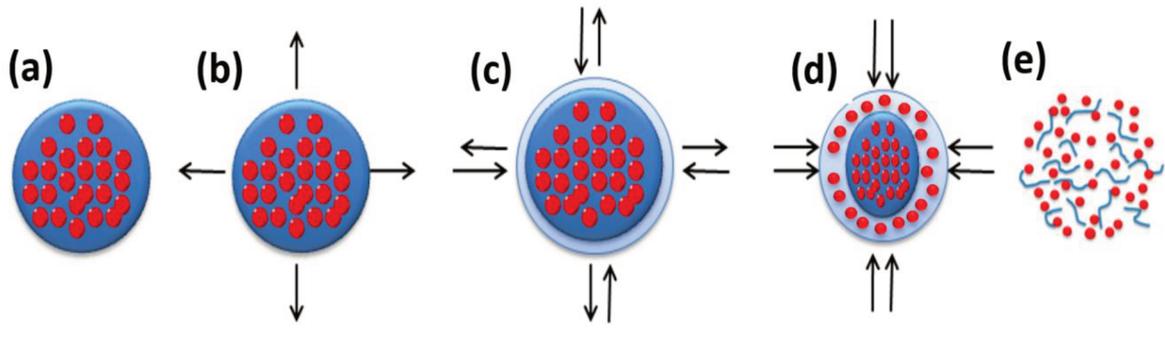
A erosão pode acontecer na superfície ou no *bulk* do agregado. Na superfície acontece quando o polímero degrada-se lentamente, iniciando na superfície até a matriz polimérica. Isto é, o tamanho do agregado é reduzido desde o exterior até interior. Este processo é favorecido quando a taxa de erosão é maior que a taxa de permeação de água no *bulk* da matriz polimérica. A baixa taxa de permeação de água é ideal para a proteção de fármacos vulneráveis à água. Por outro lado, a erosão da matriz polimérica acontece quando a taxa de permeação de água no *bulk* é alta, produzindo a degradação homogênea de toda a matriz polimérica. Este processo de liberação é pouco recomendado quando é necessário proteger o fármaco do microambiente onde será liberado (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

1.1.5 Liberação de fármacos de polímeros hidrofílicos

Em sistemas formados por polímero hidrofílicos, a liberação do fármaco encapsulado normalmente envolve mais de uns mecanismos de degradação, mencionados anteriormente (Figura 9). Matrizes hidrofílicas quando estão em contato com o meio de dissolução, adsorvem água pelos poros da matriz polimérica (Figura 9b), provocando a liberação imediata do fármaco que encontra-se na superfície, com posterior intumescimento e relaxamento das cadeias

poliméricas formando uma camada gelatinosa do polímero (Figura 9c) (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Figura 9. Mecanismo de liberação de fármacos de matrizes hidrofílicas que intumescem e sofrem erosão: a) Matriz no estado seco, b) início da hidratação e intumescimento da interface, c) incremento da hidratação, d) Intumescimento da matriz, início da erosão das cadeias poliméricas, e) separação de cadeias poliméricas com liberação rápida do fármaco interno.



Fonte: o autor.

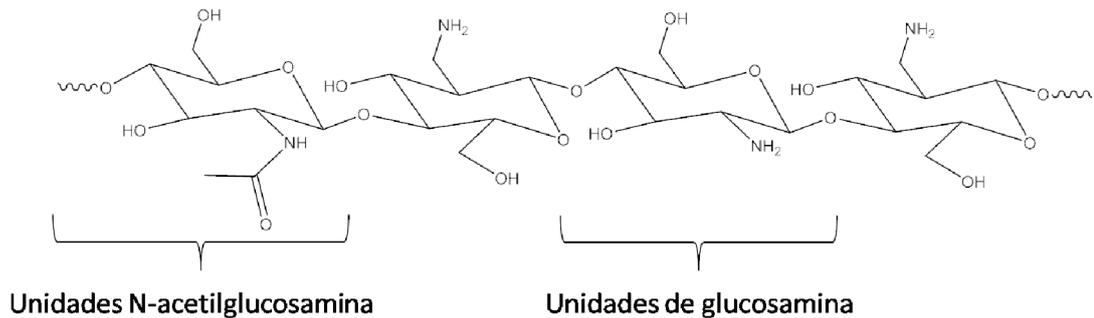
Através interface, a água continua penetrando até a matriz, à medida que o núcleo fica hidratado, a camada exterior sofre erosão. Estes dois fenômenos acontecem simultaneamente (Figura 9d). Quando a penetração da água excede um valor crítico de concentração, isto é, a concentração de água na qual as interações água-polímero são mais favorecidas que polímero-polímero, provoca a separação das cadeias poliméricas, erosão e, a geração de espaços no agregado, favorecendo a difusão do soluto. Por último ocorre o aumento da distância entre as cadeias poliméricas, e como consequência a desintegração total do sistema e liberação do fármaco residual (Figura 9e).

Um polímero utilizado na formação de nanodispositivos carreadores de fármaco é a quitosana. Este é um polissacarídeo econômico, biodegradável e atóxico. Em consequência, este biopolímero tem sido a fonte para o desenvolvimento de novas Nps, com aplicação nas áreas farmacêutica e médica (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010; VIJAY KUMAR THAKUR AND MANJU KUMAR THAKUR, 2014).

1.1.6 Quitosana

Quitosana é um polissacarídeo linear constituído por unidades de glucosamina (2-amino-2-deoxi- β -1,4-D-glicopironase) e N-acetilglucosamina (2-acetoamido-2-deoxi- β -1,4-D-glicopironase) unidas por ligações tipo β -1,4-glicosídicas (Figura 10).

Figura 10. Estrutura química da quitosana.



Fonte: *O autor.*

A quitosana é obtida a partir da desacetilação total ou parcial da quitina, a qual é extraída de conchas dos crustáceos (caranguejos, camarões, etc), insetos, aracnídeos (escorpião, aranhas, entre outros) e de microrganismos. A quitosana apresenta uma estrutura cristalina rígida estabilizada por ligações de hidrogênio, impedindo sua solubilidade em pH alcalinos ou neutros, limitando sua utilização em diversas aplicações (KURITA, 2006; SHUKLA et al., 2013; YI et al., 2005).

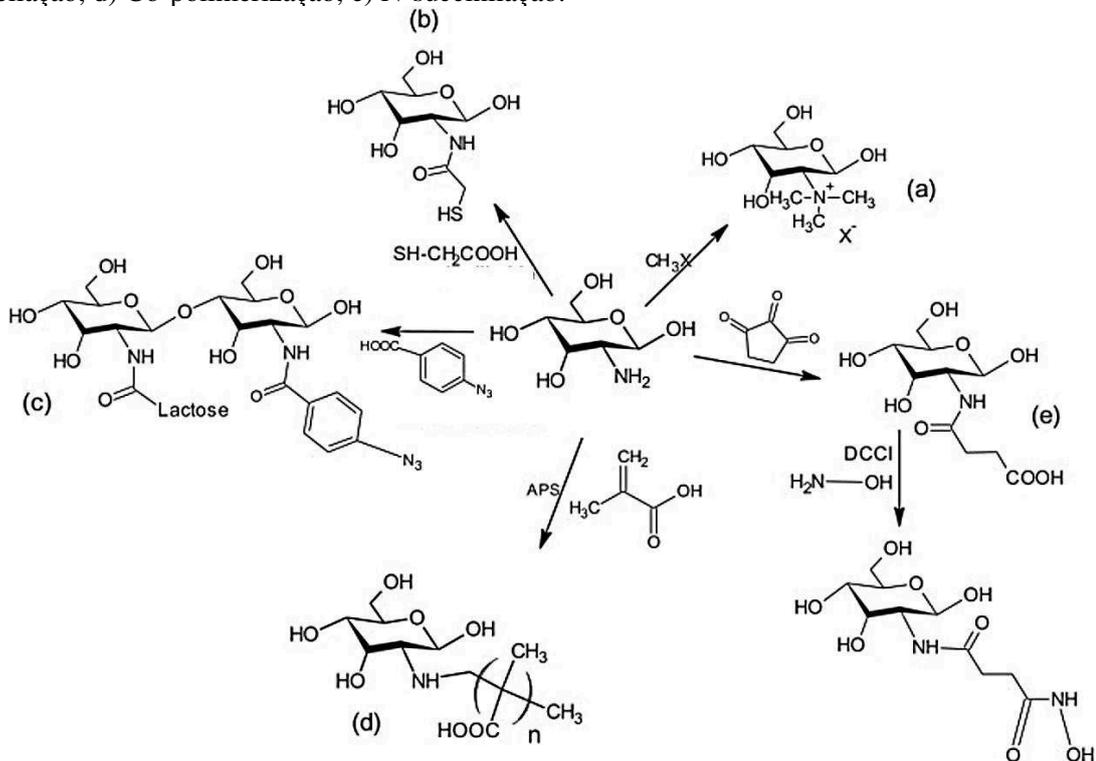
Em valores de pH menores de 6, os grupos aminos encontram-se protonados (pK_a 6,0 – 6,5) e carregados positivamente, conferindo a quitosana propriedades de um polieletrólito catiônico solúvel em solução aquosa. Acima deste pH, a quitosana inicia sua desprotonação perdendo a carga positiva, reduzindo drasticamente sua solubilidade. A faixa de pH da transição da quitosana solúvel– insolúvel, é reportada entre 6,0 e 6,5, o que depende altamente do grau de N-acetilação e massa molar do polímero (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015).

Certamente a baixa solubilidade da quitosana é uma problemática para sua utilização e aplicação em pH neutros e alcalinos. Porém, as propriedades físico-químicas deste polímero podem ser alteradas por meio de modificações químicas, produzindo assim, inúmeros derivados solúveis com aplicação numa ampla faixa tecnológica. Neste contexto, a modificação e/ou inserção de grupos funcionais na quitosana tem sido foco de investigação, com o fim de incrementar sua solubilidade e ampliar a faixa de aplicação tecnológica.

1.1.7 Derivados de quitosana

A quitosana apresenta dois tipos de grupos reativos que podem ser modificados; i) grupos aminos livres nas unidades desacetiladas e ii) grupos hidroxila nos carbonos 3 e 6 nas unidades acetiladas e desacetiladas (DUNG et al., 1994; MOTIEI; KASHANIAN, 2017; SHUKLA et al., 2013). A Figura 11 mostra algumas das funcionalizações e modificações químicas da quitosana como: metilação, tiolação, acilação, co-polymerização, e N-succinilação (SHUKLA et al., 2013).

Figura 11. Modificações químicas das unidades glucosamina da quitosana: a) Metilação, b) Tiolação, c) Acilação, d) Co-polymerização, e) N-succinilação.



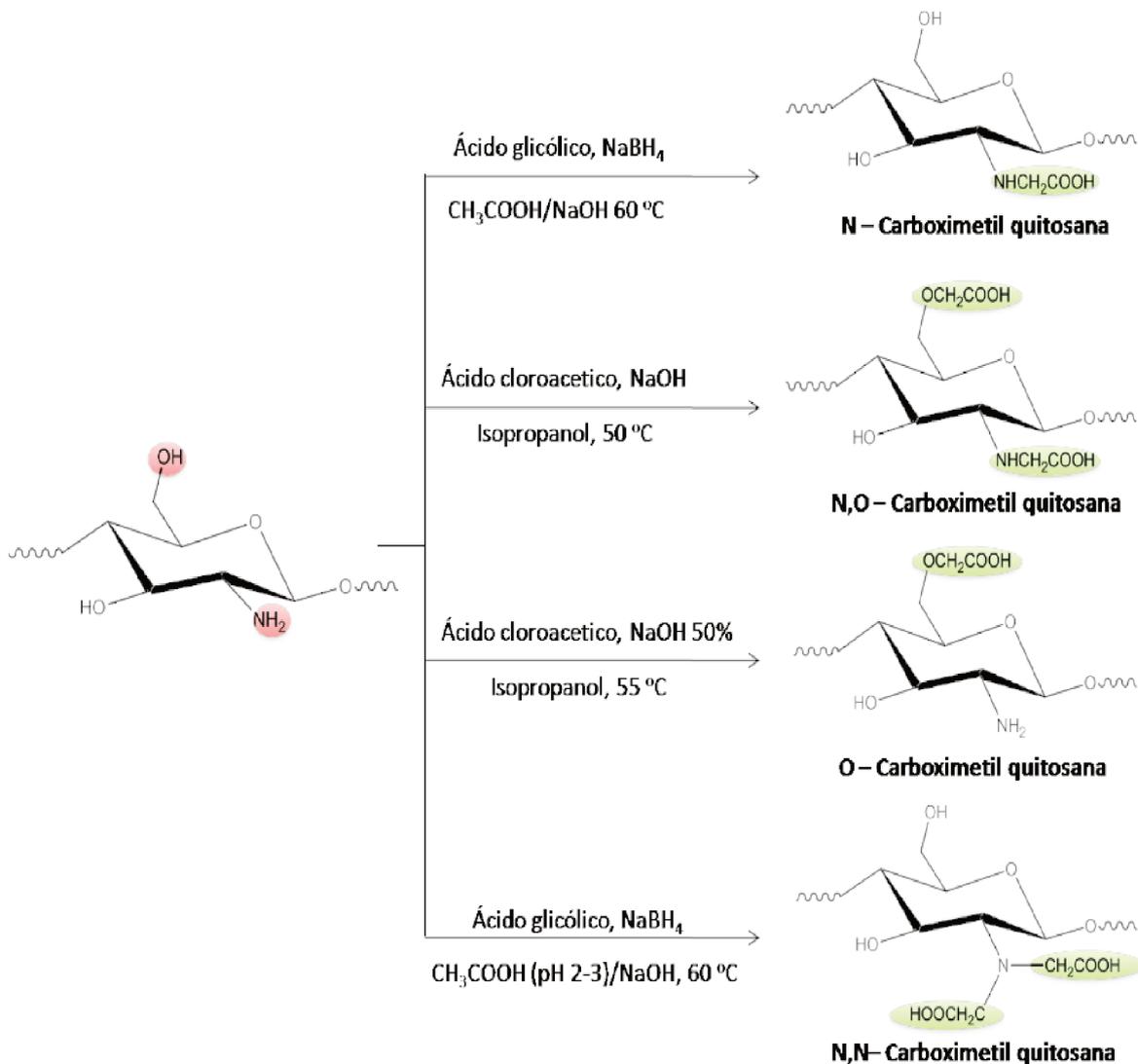
Fonte: Adaptada da literatura (SHUKLA et al., 2013).

Entre os derivados mais versáteis da quitosana, a carboximetil quitosana (CMQ) é um dos mais utilizados em aplicações biológicas porque apresenta grande solubilidade em meio aquoso e capacidade anfotérica (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017; ZHAO et al., 2011). Quatro derivados da quitosana carboximetilada tem sido reportado na literatura; O-Carboximetil quitosana (O-CMQ), N-Carboximetil quitosana (N-CMQ), N,N-Carboximetil quitosana (N,N-CMQ), e N,O-Carboximetil quitosana (N,O-CMQ), em que a substituição do grupo carboximetil ocorre no grupo hidroxila primário no grupo amino ou em ambos os grupos das unidades glucosamina, respectivamente (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2014). Estes

derivados têm sido utilizados na formação de nanodispositivos aplicados em diferentes sistemas biológicos, como no diagnóstico *in vitro*, bioimagem, biossensores, terapia genética e liberação controlada de fármacos (MI; WU; CHEN, 2015; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2014; UPADHYAYA et al., 2014).

A obtenção de cada derivado depende das condições de reação (Figura 12). O O-CMQ requer meio alcalino forte (são reportadas concentrações entre 40 – 50% m/v de NaOH) para ativar o grupo hidroxila e posterior reação com cloroacetato de sódio sólido ou em solução aquosa a temperatura ambiente.

Figura 12. Rota sintética das carboximetil quitosana.



Fonte: O autor.

Por outro lado, O N-CMQ e N,N-CMQ precisam a adição de ácido glicóxico e pH 4,5 para que seja favorável a formação da imina, com posterior redução com cianoborohidreto ou borohidreto de sódio. Já para obter o N,O-CMQ é necessário meio ligeiramente alcalino, e uma temperatura de 60 °C para que a reação aconteça em ambos grupos funcionais (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2014). A solubilidade destes derivados em meio aquoso depende principalmente do grau de substituição e do pH do sistema. Quanto maior for o grau de substituição, haverá mais grupos ionizáveis na cadeia hidrocarbônica, permitindo maior solubilidade. Por outro lado, o pH determina o balanço de carga negativas e positivas, sendo que em meio ácido predominam as cargas positivas (pela protonação dos grupos amino) e em pH neutro ou básico predominam cargas negativas (pela dissociação dos grupos carboxílicos) (UPADHYAYA et al., 2014).

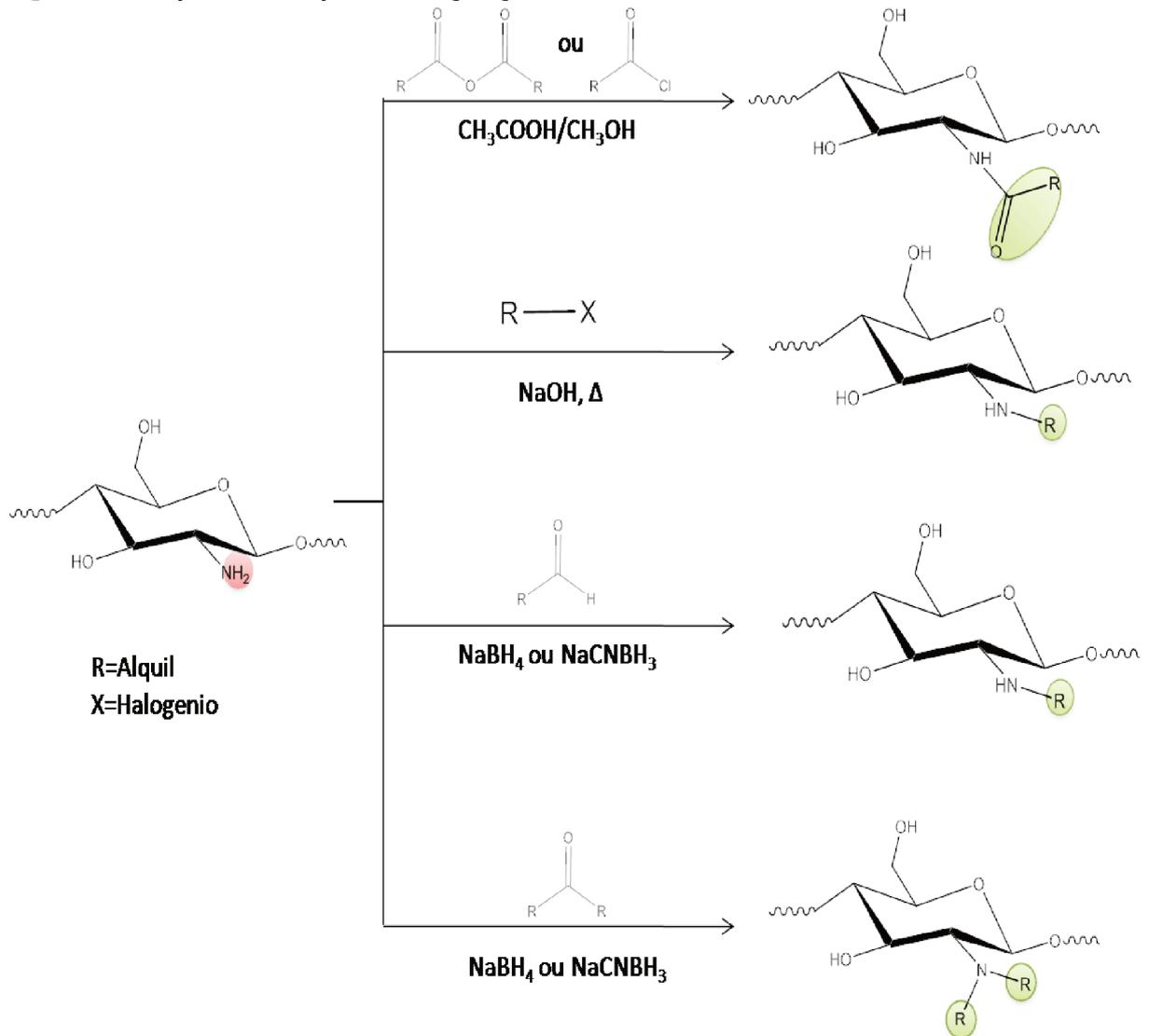
Estes derivados têm sido aplicados na formação de micropartículas e Nps, utilizando diversos métodos de preparação como; microemulsão, co-precipitação, reticulação iônica, eletrofiação, gelificação iônica e por auto-agregação (ALVES; MANO, 2008; KURITA, 2006; UPADHYAYA et al., 2014). Esta última caracteriza-se pela formação espontânea de agregados em solução, porém é necessário a inserção de cadeias hidrocarbônicas no polissacarídeo.

1.1.8 N-alkil-carboximetil quitosana

As inserções de grupos alquil na CMQ geram biopolímeros com características anfifílicas, atividade superficial e auto-agregação em solução, permitido sua aplicação na formação de filmes de Langmuir-Blodgett, membranas, Nfs, vesículas poliméricas e Nps (ALVES; MANO, 2008; HSIAO et al., 2015). No entanto, a formação de agregados em solução aquosa depende da comprimento da cadeia hidrocarbônica dos substituintes. Desbieres *et al.* sintetizaram diferentes N-alkil-carboximetil quitosana por redução do grupo amino utilizando anidridos carboxílicos de diferentes comprimento da cadeia carbônica (C_n entre 3 – 14 carbonos). Medidas de viscosidade mostraram que o substituinte deve conter no mínimo 6 carbonos para que o derivado apresente características hidrofóbicas. Cadeias hidrocarbônicas com mais de 14 carbonos reduzem a solubilidade do polímero em solução aquosa e a biodegradabilidade do polissacarídeo (DESBRIÈRES et al., 1997). Mesmo com características anfifílicas, N-alkil-carboximetil quitosana de elevada massa molar ($M_w > 300,000$) são solúveis somente em meio ácido (pH < 6) e apresentam capacidade de formar gel em concentrações altas. Várias rotas sintéticas têm sido reportadas na literatura para a obtenção de

N-alquil-carboximetil-quitosana, sendo as mais utilizadas, as reações com halogeneto de alquila, aminação redutiva e acilação (Figura 13).

Figura 13. Reação de formação da N-alquil quitosana.



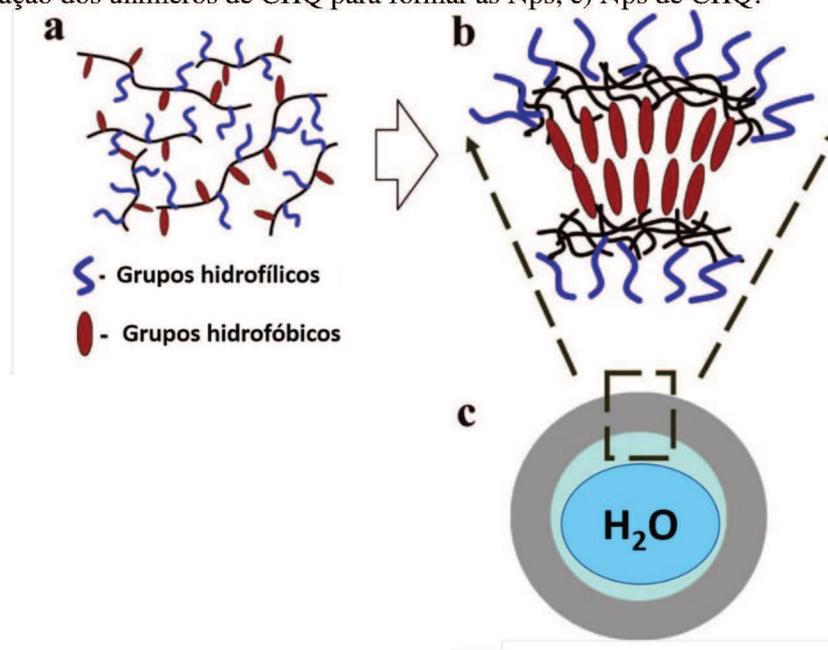
Fonte: O autor.

A reação direta do grupo amino com o halogeneto de alquila requer condições vigorosas de reação como alta temperatura e altas concentrações de hidróxido de sódio. Porém, esta metodologia obtém baixo grau de substituição e degradação do polímero. A aminação redutiva por aldeídos e cetonas consta de duas etapas, primeiramente acontece a formação da base de *Schiff* em meio ligeiramente ácido (pH na faixa de 4 - 6), seguido da redução da base

de *Schiff* com cianoborohidreto de sódio ou borohidreto de sódio numa faixa de pH de 4 – 8. Por último, a acilação com cloreto de acila é das rotas sintéticas mais rápidas e simples, porque só requer meio ligeiramente ácido, como ácido acético/metanol e temperatura ambiente (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2014; SHUKLA et al., 2013; YI et al., 2005).

A formação de agregados com nichos hidrofóbicos e hidrofílicos é uma das principais características das N-alquil-quitosana, permitindo sua aplicação na encapsulação e liberação controlada de fármacos. Tem se usado Nps de N-octil-N-trimetil quitosana com diâmetro entre 24 – 280 nm na encapsulação de 10 – hidroxycamptotecina, com porcentagens de encapsulação de 32,5% (ZHANG et al., 2007). Porém, estes sistemas coloidais coalescem em pH > 7 limitando sua aplicação em ensaios biológicos. Versões anfifílicas de alquil-carboximetil-quitosana tem sido foco de estudo para superar esta problemática. Tse-Ying Liu *et al.*, (2006) sintetizaram e caracterizaram por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) N-hexanoil - carboximetil quitosana (CHQ) substituindo em meio ácido com anidrido hexanóico e posterior formação de hidrogel para a encapsulação de ibuprofeno (15-60% de eficiência de encapsulação) (LIU et al., 2006). Posteriormente, este biopolímero foi utilizado para formar Nps de CHQ com raios entre 20 – 222 nm (Figura 14), aplicando o sistema na encapsulação de doxorubicina, um agente anticanceroso com atividade biológica, com autoagregação do biopolímero e considerável capacidade de encapsulação (25-60%) (LIU et al., 2008).

Figura 14. Formação de Nps pela da autoassociação de CHQ. a) unimeros de CHQ em solução, b) associação dos unimeros de CHQ para formar as Nps, c) Nps de CHQ.



Fonte: Adaptada da literatura (LIU et al., 2008).

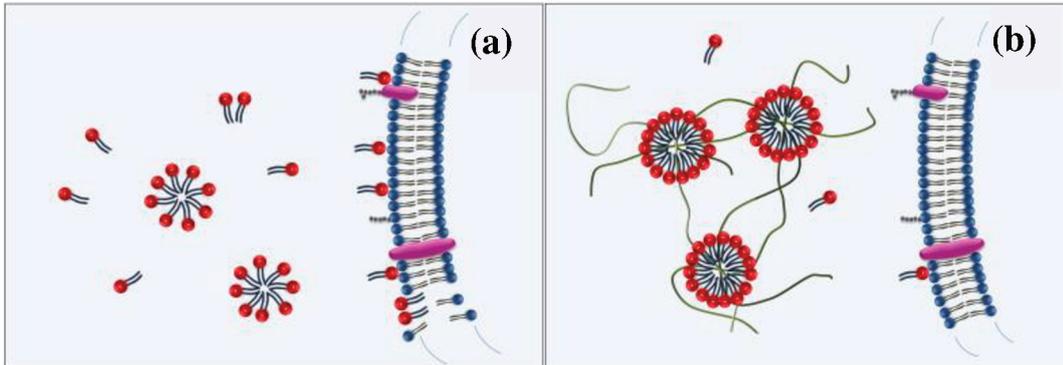
Nps de quitosana apresentam baixa estabilidade em suspensão e tendência de aglomeração. Assim, na maioria de formulações de Nps de quitosana e quitosna quimicamente modificada é necessário a utilização de outro componente para diminuir a instabilidade do sistema coloidal (RAMPINO et al., 2013). Pesquisas têm demonstrado que derivados de alquil-carboximetil quitosana interagem com surfactantes por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, sendo que a adsorção de surfactantes no biopolímero favorece a solubilidade e estabilidade em solução aquosa (DESBRIÈRES et al., 1997). Porém, surfactantes aniônicos ou catiônicos em ausência de outros componentes são pouco biocompatíveis, principalmente porque interagem com a camada lipídica das células provocando alterações da membrana, e limitando sua aplicação na medicina e farmácia (DONG et al., 2009).

Recentemente Calejo *et al.* (CALEJO et al., 2013), determinaram que surfactantes derivados da lisina diminuem sua atividade citotóxica quando estão na presença de etil(hidroxietil) celulose. Os autores atribuem este comportamento à favorável interação entre o polissacarídeo e o surfactante, diminuindo sua disponibilidade para interagir com a membrana celular (Figura 15). Neste sentido, surfactantes como o SDS poderiam diminuir sua citotoxicidade ao interagir com biopolímeros modificados com grupos hidrofóbicos como a CHQ, permitindo sua aplicação na liberação controlada de fármacos.

1.1.9 Surfactantes

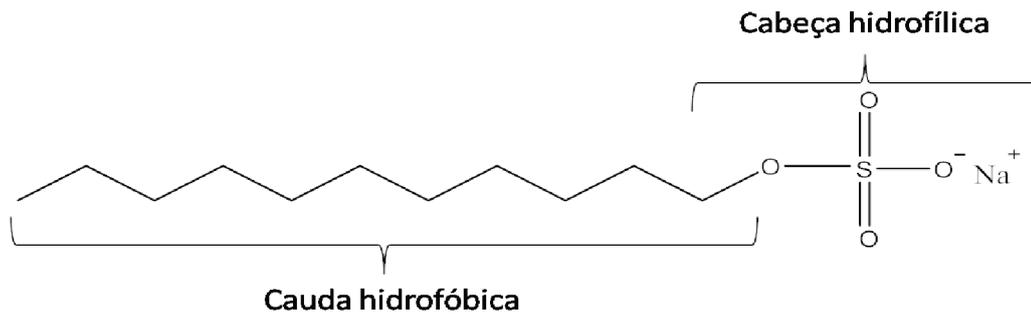
Surfactantes são compostos químicos anfifílicos que possuem a capacidade de reduzir a tensão interfacial de soluções aquosas, mesmo encontrando-se em baixas concentrações. Esta propriedade físico-química acontece pela presença de duas regiões com diferentes polaridades na estrutura molecular; uma hidrofóbica, normalmente chamada de cauda e outra hidrofílica, geralmente a cabeça do surfactante (Figura 16). Isto pode ser observado no SDS o qual apresenta uma cauda hidrofóbica de 12 carbonos e uma cabeça hidrofílica com carga negativa composta por um grupo sulfato. O SDS é amplamente estudado na interação com macromoléculas (polímeros e proteínas) por ser um composto aniônico modelo com atividade superficial e com características físico-químicas reportadas na literatura (DESBRIÈRES et al., 1997; PANMAI et al., 2002).

Figura 15. Interação de surfactante com a membrana celular, a) Em ausência de etil(hidroxi)etil celulose, b) Em presença de etil(hidroxi)etil celulose.



Fonte: Adaptada da literatura (CALEJO et al., 2013).

Figura 16. Estrutura molecular do dodecilsulfato de sódio.



Fonte: O autor.

A carga do surfactante permite classificá-los em: i) iônicos, surfactantes que se dissociam em solução aquosa em monômeros (uma molécula do surfactante) com carga negativa (surfactante aniônico) ou positiva (surfactante catiônico), ii) zwitteriônico, surfactantes que apresentam cargas negativas e positivas em sua estrutura molecular, sendo a carga total igual zero, e iii) Não-iônicos, surfactantes que não apresentam carga (PANMAI et al., 2002).

1.1.10 Comportamento de um surfactante em solução aquosa

Quando é adicionado surfactante em baixa concentração em solução aquosa, monômeros do surfactante se transportam espontaneamente do *bulk* da solução para a interface ar-líquido. Este processo é conhecido como adsorção e acontece para diminuir a energia livre de Gibbs da interface do sistema. Neste processo, os monômeros de surfactante posicionam as

caudas hidrofóbicas do surfactante em direção à fase gasosa e a cabeça hidrofílica interagindo com as moléculas de água para diminuir o máximo possível o excesso de energia livre de Gibbs (tensão superficial, γ) do sistema.

Com o aumento da concentração do surfactante na solução, continua o processo de adsorção até atingir a saturação energética da interface ar-líquido. Neste ponto é favorecido o processo de agregação no *bulk* da solução, denominada concentração micelar crítica (cmc), que é a concentração mínima de surfactante no sistema para que aconteça a formação espontânea de micelas na solução.

O fenômeno de auto-agregação das moléculas de surfactante para formar micelas em solução aquosa acontece para diminuir a energia livre de Gibbs do sistema, sendo um processo dirigido por uma força motriz entrópica e não entalpia. Basicamente, o aumento da entropia no sistema é causado pela dessolvatação das moléculas de água das cadeias hidrofóbicas do surfactante. Para que haja a formação de agregados em solução tem que haver a interação hidrofóbica das caudas dos monômeros livres em solução. Contudo, primeiramente deve ocorrer a ruptura da interação cauda hidrofóbica-H₂O (dessolvatação), aumentando assim, a entropia rotacional e configuracional das moléculas de água e logo a entropia do sistema (PANMAI et al., 2002).

1.1.11 Interação entre polissacarídeos-surfactantes

Surfactantes interagem com polieletrólitos por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas para formar agregados supramoleculares chamados de complexos polieletrólito – surfactante. Normalmente, utiliza-se a nomenclatura SPECs (do inglês, *surfactant polyelectrolyte complexes*) para este tipo de agregados. A interação destas espécies é monitorada por dois parâmetros a cac (concentração de agregação crítica) e a psp (ponto de saturação do polímero). A cac é a faixa de concentração na qual há interação intermolecular entre o surfactante e o polieletrólito. Já a psp é a faixa de concentração na qual é saturada energeticamente a interface do polieletrólito pelo surfactante (DE MODOLON et al., 2009). Assim, a interação é regida basicamente por três regiões:

i) $0 < C_s < cac$: Faixa de concentração o surfactante encontra-se dissociado em sua forma monomérica.

ii) $cac < C_s > psp$: região na qual o surfactante monomérico está em equilíbrio dinâmico com os complexos SPECs. A concentração de monômeros no sistema é igual á cac.

iii) $C_s > psp$: Em concentrações superiores do psp, qualquer adição de surfactante leva a formação de micelas. Portanto há um equilíbrio dinâmico entre monômeros de surfactante, SPECs e micelas no sistema.

Várias técnicas são utilizadas para pesquisar as interações e formação de agregados entre polissacarídeos-surfactantes iônicos como: condutividade, tensão interfacial, fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS), calorimetria de titulação isotérmica (ITC), potencial zeta. Neste trabalho será realizada uma breve descrição do DLS e o ITC.

1.1.12 Técnicas utilizadas para o estudo da interação macromolécula – surfactante.

1.1.12.1 Espalhamento de luz

Morfologia, polidispersidade e tamanho de Nps são parâmetros importantes na formação e caracterização de sistemas coloidais. O espalhamento de luz permite conhecer estas características sendo na atualidade uma ferramenta essencial nas pesquisas destes sistemas.

O espalhamento de luz está baseado em dois fenômenos: o efeito Tyndall e o movimento browniano. Basicamente, o efeito Tyndall acontece quando a luz atinge uma partícula ou grupo de partículas provocando mudança na direção da radiação, este fenômeno é também conhecido como espalhamento de luz e por isso o nome da técnica. Por outro lado, o movimento browniano é o movimento aleatório de partículas de tamanho micrométrico suspensas em um fluido (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). Com base nestes efeitos é possível fazer dois tipos de medidas em espalhamentos de luz, o espalhamento de luz estático (SLS) e o DLS. Neste trabalho, vai-se focar em discutir brevemente o DLS.

Para obter informação do tamanho das partículas é utilizado o DLS. Este foca-se em medir as flutuações temporais da luz espalhada para obter espectros de flutuação da partícula no tempo, fornecendo informação sobre o coeficiente de difusão e tamanho das partículas (HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

A informação quantitativa da luz espalhada no tempo é processada mediante uma função de autocorrelação. Esta é uma função normalizada que descreve como varia a intensidade de luz espalhada no tempo. Considerando uma variação da intensidade espalhada que é monitorada no tempo e que $I(t)$ representa a intensidade espalhada no tempo t , a intensidade de luz espalhada depois de um tempo de decaimento τ é $I(t + \tau)$. Assim, a função de autocorrelação pode-se normalizar e é representada pela equação 1.

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

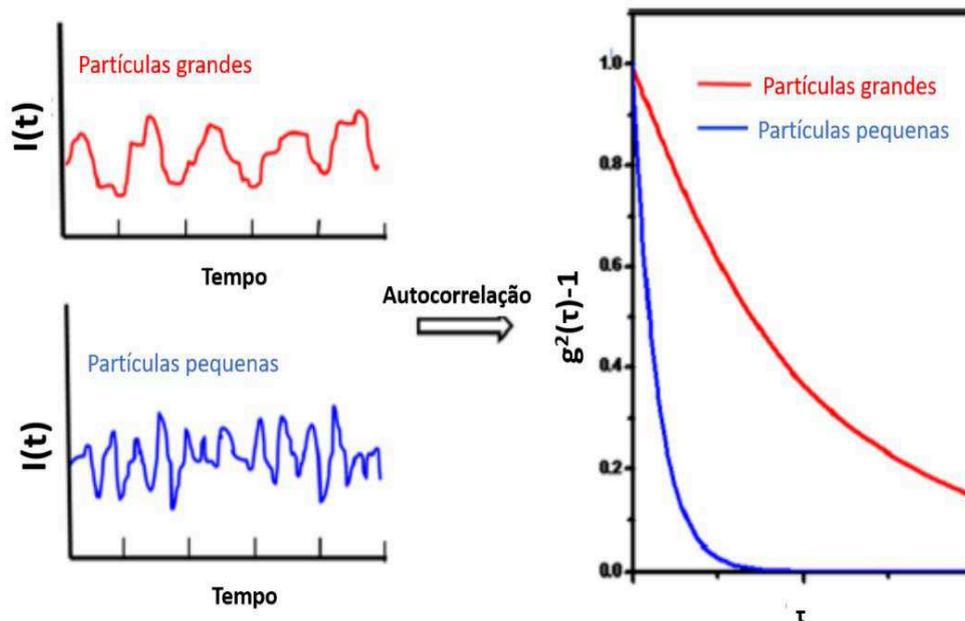
Para realizar a contagem dos fótons espalhados, a função de correlação $g^2(\tau)$, é descrita por uma função de correlação de primer orden do campo elétrico $g^1(\tau)$ pela equação 2.

$$g^1(\tau) = [g^2(\tau) - 1]^{0,5} \quad (2)$$

Assim, podemos observar o comportamento de um particulado por meio da função $g^2(\tau) - 1$ vs τ (Figura 17).

Quando o particulado é muito pequeno, a flutuação da intensidade de espalhamento é rápida no tempo de análise, e conseqüentemente o tempo de decaimento da função $g^2(\tau) - 1$ é menor, comparando com partículas grandes. Portanto, é possível fazer uma análise qualitativa do tamanho de diferentes dispersões pelo comportamento da função de autocorrelação.

Figura 17. Variação da intensidade de espalhamento e função de autocorrelação para suspensões de diferente tamanho de partícula.



Fonte: Adaptada da literatura (HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

Um tratamento matemático da função de autocorrelação permite determinar o coeficiente de difusão e o raio hidrodinâmico médio (R_H) das partículas. Para uma amostra

monodispersa de partículas esféricas, a função de correlação decai exponencialmente com o tempo de decaimento (equação 3).

$$g^1(\tau) = Ae^{-\Gamma\tau} + B \quad (3)$$

Onde A é a amplitude da função de correlação, B é a linha base, $\Gamma = 1/\tau$ é a frequência de relaxação, sendo τ é o tempo de decaimento e se relaciona com o coeficiente de difusão (D) da partícula (equação 4).

$$\Gamma = Dq^2 \quad (4)$$

Onde q é o modulo do vetor de espalhamento (equação 5). Sendo n o índice de refração do solvente, λ o comprimento de onda do laser utilizado para realizar as medidas e θ o ângulo no qual é medida a intensidade luz espalhada pelas partículas.

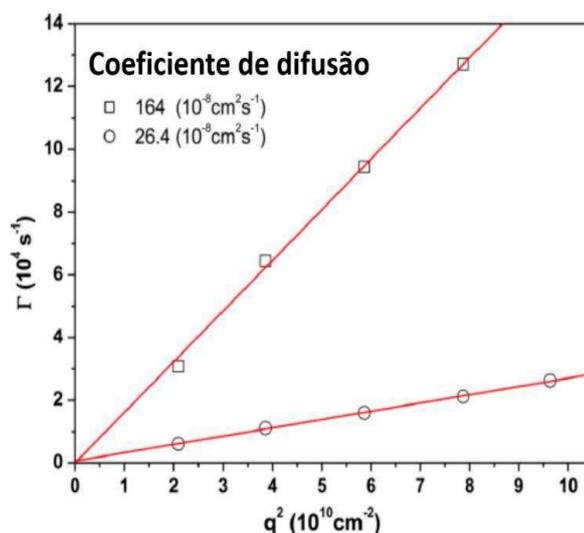
$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (5)$$

O coeficiente de difusão varia linearmente com a concentração do particulado dentro de um regime diluído ($D = D_0(1 + K_D(c) + \dots)$). Onde K_D é o coeficiente virial hidrodinâmico e D_0 é o coeficiente de difusão na condição de diluição infinita (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). Portanto, considerando uma amostra em diluição infinita ($D \cong D_0$) é possível determinar o R_H por meio da equação de Stokes-Eintein (equação 6).

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D_0} \quad (6)$$

Onde k é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente e T é a temperatura absoluta. O R_H pode-se determinar utilizando um só ângulo, ou pela correlação de vários ângulos. Para isto, determina-se o tempo de decaimento em diferentes ângulos de espalhamento (normalmente de 30 – 150°) e assim obter o gráfico Γ vs q^2 (Figura 18) linearizado e ajustado com intercepto zero para cumprir a equação 4. Onde a inclinação do gráfico é o coeficiente de difusão do particulado.

Figura 18. Variação da frequência de relaxação (Γ) em função do quadrado do vetor de espalhamento (q^2) para particulado com diferente R_H .



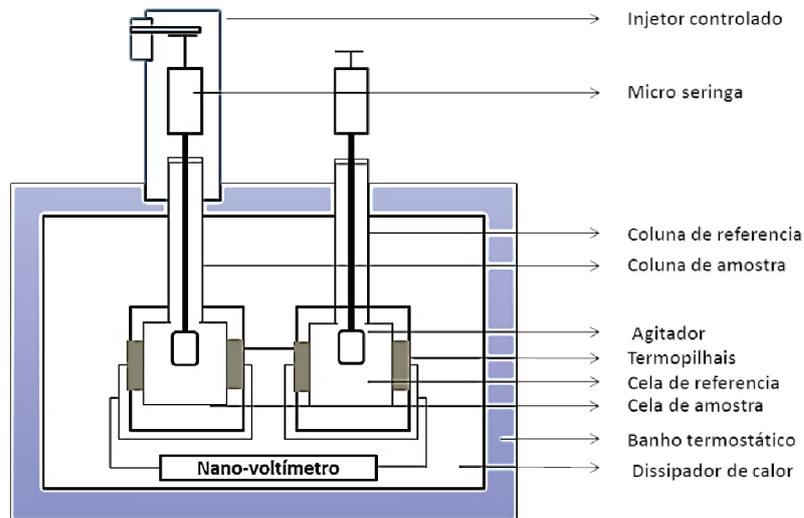
Fonte: Adaptada da literatura (HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

1.1.12.2 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Interação macromoléculas – surfactante envolve transferências de energia entre os componentes do sistema e a vizinhança do sistema. Este é o conceito fundamental que utiliza a ITC. Utilizando esta técnica é possível determinar a quantidade de energia absorvida ou liberada na interação entre macromoléculas e surfactante em condições de temperatura e pressão constante. Em um ITC (Figura 19) adiciona-se à solução titulante (normalmente o surfactante) dentro de uma cela calorimétrica por meio de um injetor controlado mecanicamente. A cela calorimétrica contendo uma solução (normalmente a macromolécula) encontra-se com agitação constante, a temperatura controlada e em equilíbrio térmico com suas vizinhanças.

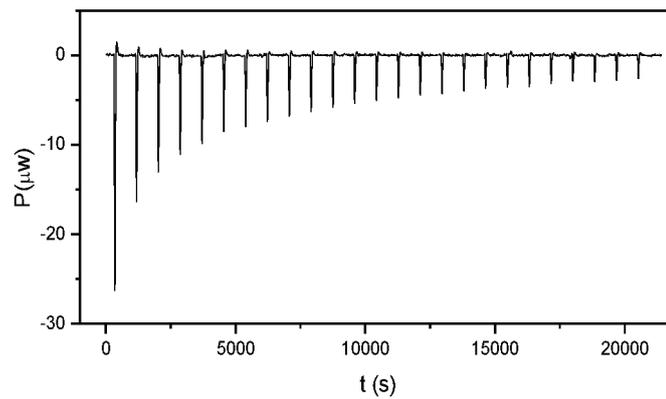
Quando as duas soluções são misturadas acontece formação e/ou rompimento de interações intermoleculares entre as espécies químicas presentes no sistema, provocando uma mudança na temperatura do sistema e alteração do equilíbrio térmico entre o sistema e a vizinhança. Assim, para atingir novamente o equilíbrio térmico há uma transferência de energia na forma de calor entre o sistema e a vizinhança. A energia na forma de calor é detectada por termopilhas localizadas lateralmente às celas calorimétricas, gerando uma diferença de potencial elétrico. Assim, o ITC fornece dados de potência (quantidade de energia por unidade de tempo) em função do tempo (Figura 20).

Figura 19. Calorímetro de titulação isotérmica (ITC).



Fonte: O autor.

Figura 20. Variação da potência no tempo de um termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC).



Fonte: O autor.

A quantidade de energia na forma de calor (q) absorvida ou liberada pelo sistema por unidade de tempo para cada injeção é calculada usando a equação 7.

$$q = \int_{t_1}^{t_2} P dt \quad (7)$$

O calor em cada injeção vai ser numericamente igual à variação de entalpia de interação. Isto pode ser demonstrado utilizando a primeira lei da termodinâmica (equação 8).

$$dU = dq + dw \quad (8)$$

Onde dU , dq e dw são a variação infinitesimal da energia interna do sistema, a variação infinitesimal da energia na forma de calor e a variação infinitesimal da energia na forma de trabalho, respectivamente. Se o sistema só pode realizar trabalho de expansão e compressão a pressão constante a equação 8 transforma-se na equação 9.

$$dU = dq - P_{\text{ext}}dV \quad (9)$$

Onde P_{ext} , dV são a pressão externa do sistema e a variação infinitesimal do volume do sistema, respectivamente. Se o sistema apresenta uma variação finita, é possível integrar a equação de um estado inicial para um final (equações 10-13).

$$\int_f^i dU = \int_f^i dq - \int_f^i P_{\text{ext}}dV \quad (10)$$

$$U_f - U_i = q - P_{\text{ext}}(V_f - V_i) \quad (11)$$

$$U_f - U_i = q - P_{\text{ext}}V_f + P_{\text{ext}}V_i \quad (12)$$

$$(U_f + P_{\text{ext}}V_f) - (U_i + P_{\text{ext}}V_i) = q \quad (13)$$

Denominando o termo $U + P_{\text{ext}}V$ como entalpia (H) na equação 13, encontra-se que a energia na forma de calor é igual à diferença da entalpia final (H_f) e inicial (H_i), em outras palavras uma variação de entalpia (equação 14).

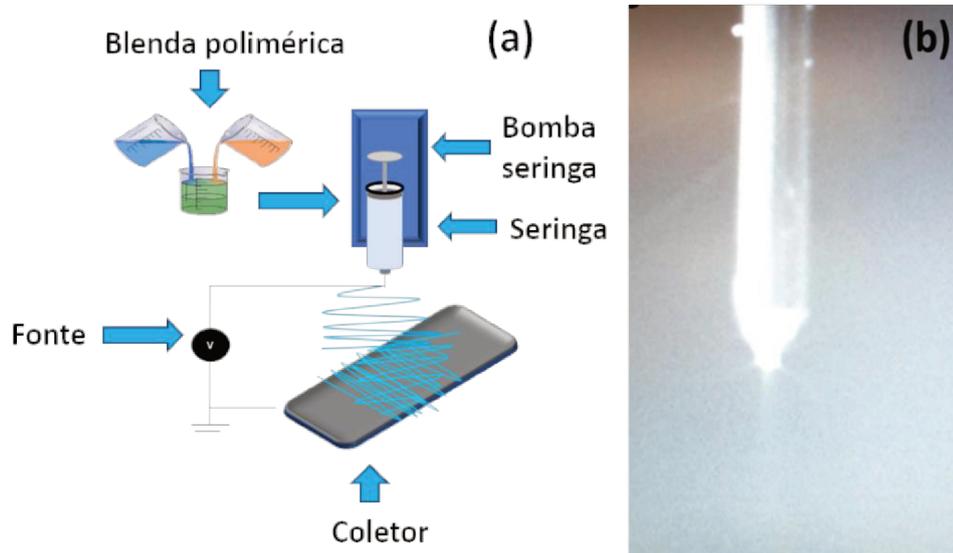
$$\Delta_{\text{pro}}H = q \quad (14)$$

A anterior equação mostra que é possível conhecer a variação de entalpia de um processo termodinâmico em condições de pressão constante, se conhecermos a quantidade de energia trocada na forma de calor entre o sistema e a vizinhança. É importante mencionar que pese a igualdade na equação 14, a variação da entalpia e o calor são dois conceitos diferentes. A entalpia é energia interna do sistema (variação da energia translacional, vibracional, rotacional e eletrônica) mais o trabalho de compressão ou expansão que realize o sistema. E por outro lugar, o calor é a transferência de energia por um gradiente de temperatura.

1.1.13 Nanofibras

Nanofibras é um dos nanomateriais mais versáteis que existe com grande área interfacial e alta porosidade, fazendo-o candidato atrativo em múltiplas aplicações como: liberação de fármacos (KIM; EBARA; AOYAGI, 2013), células solares (KIM; EBARA; AOYAGI, 2013), produção de baterias (KIM; EBARA; AOYAGI, 2013), curativos de feridas (LI et al., 2013), fotocatalises (WANG et al., 2008), detecção de substratos e ativos biológicos (WANG et al., 2008), filtração e purificação de água (WANG et al., 2008), entre outras aplicações.

Figura 21. a) Ilustração do eletrospinner, b) Cone de Taylor.



Fonte: Adaptada da literatura (XUE et al., 2017).

Eletrofiação é uma metodologia simples para formar Nfs, na qual é utilizado um eletrospinner (Figura 21). Este aparelho consiste em quatro componentes: 1) uma fonte de alta voltagem, 2) uma bomba de seringa, 3) uma seringa com agulha metálica e 4) um coletor. Basicamente, quando é bombeada uma quantidade de fluido viscoelástico (solução polimérica a ser eletrofiada) pela seringa, forma-se um formato esférico do fluido por efeito da γ . No entanto, ao aplicar uma diferença de potencial elétrico ao fluido, a interface do líquido será coberta por cargas (da mesma carga), onde a repulsão entre as cargas desestabilizará a forma esférica do fluido. No momento que a repulsão das cargas supere o efeito da γ , a gota se deformará em forma de cone, conhecido como cone de *Taylor* (Figura 21b). Como consequência da repulsão das cargas, o *Jet* diminui seu diâmetro até desdobrar-se, e

posteriormente o *Jet* se acelera e diminui seu diâmetro ao mesmo tempo em que acontece a evaporação do solvente. Finalmente, o *Jet* de fluido se solidifica sobre o coletor para formar as Nfs (SILL; VON RECUM, 2008; WANG et al., 2008).

1.1.13.1 Aplicação de nanofibras na medicina

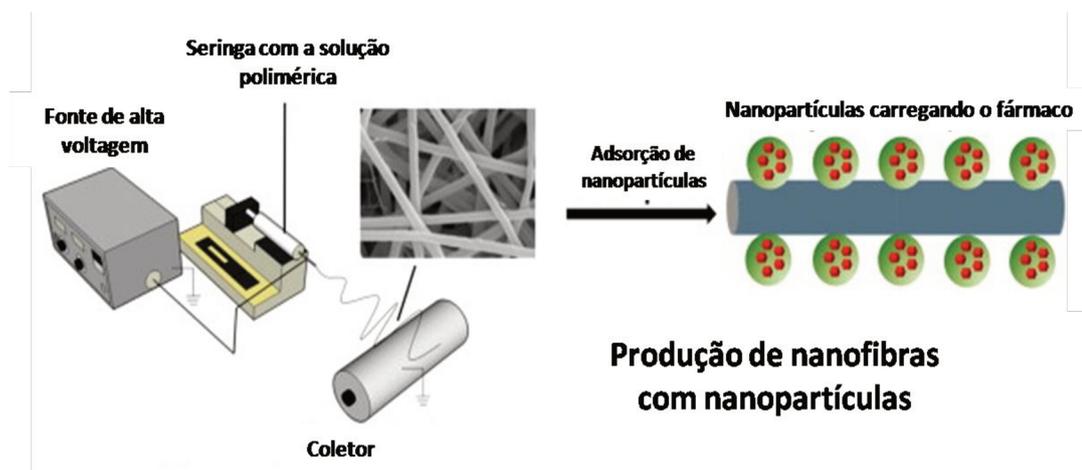
Uma das aplicações mais promissoras das Nfs é a encapsulação de fármacos e agentes terapêuticos. Até a data, diferentes materiais têm sido utilizados para formar Nfs, como polímeros sintéticos e nanomateriais a base de carbono, estes são considerados materiais flexíveis frente à sua síntese e modificação química. Porém, não apresentam afinidade celular e biocompatibilidade. Por outro lado, os polímeros naturais exibem alta biocompatibilidade, e atoxidade. Destacando os polissacarídeos (celulose, quitina, quitosana) e as proteínas (colágeno, gelatina), os quais têm sido amplamente aplicados na engenharia de tecidos e curativos de ferida (KENRY; LIM, 2017). Porém, a formação de Nfs para quimioterapia local no tratamento contra o câncer tem sido pouco explorada. Comparada com outros sistemas nanoestruturados como micelas, hidrogéis e Nps, as Nfs reduzem a toxicidade e incrementa a concentração do fármaco no local de ação farmacêutico (SILL; VON RECUM, 2008). Isto permitiria a combinação da remoção cirúrgica para remover o tumor com posterior tratamento local para diminuir a probabilidade que o tumor volte aparecer.

No tratamento contra o câncer, diferentes fármacos com atividade anticancerígena como doxorubicina (DOX), paclitaxel, complexos de platina e dicloroacetato foram encapsulados em Nfs, com o objetivo de aplicar na quimioterapia local (KENRY; LIM, 2017). Por exemplo, tem se encapsulado DOX em Nfs de poli(ácido L- láctico) (PLLA), avaliando sua liberação sobre carcinoma hepático em camundongos, encontrando aproximadamente que o 99% do DOX é liberado e difundido até o tumor inibindo o crescimento do tumor com poucos efeitos colaterais (LIU et al., 2013). Por outro lado, tem se reportado a encapsulação de dicloroacetato em Nfs de ácido poliláctico (PLA), e posteriormente aplicado em tumores sólidos de camundongos. cerca de 96% do volume do tumor foi suprimido em menos de 19 dias e os tumores subcutâneos desapareceram dos 50% dos camundongos utilizados nos experimentos (LIU et al., 2013). Estes resultados demonstram que as Nfs contendo fármacos são uma boa alternativa para o tratamento na quimioterapia localizada. No entanto, muito do

fármaco liberado pelas Nfs não conseguem atingir, nem penetrar a membrana celular. Isto, faz que sejam necessárias altas quantidades do fármaco nas Nfs para que o sistema seja eficiente e altamente citotóxico.

Uma alternativa a essa limitação é a utilização de sistemas hierarquicamente estruturados, como a adsorção de Nps carreadoras do composto ativo na interface das Nfs (Figura 22), permitindo diferentes perfis de liberação, que as nanofibras por si só não teriam. É de esperar que as Nps contendo o fármaco sejam constantemente liberadas, permitindo um tratamento contínuo em comparação as Nps só. Além disso, as Nps aumentariam a internalização da membrana celular, superando os inconvenientes de quando só se utilizam as Nfs como material carreador (LIU et al., 2013).

Figura 22. Ilustração da produção de nanofibras com nanopartículas adsorbidas na interface.



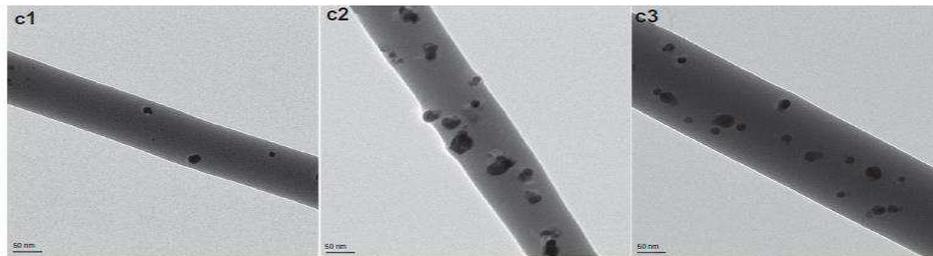
Fonte: Adaptada da literatura (YOO; KIM; PARK, 2009).

Na combinação Nps-Nfs, Nps metálicas apresentam um maior avanço em termos de pesquisa, principalmente, porque nanoagregados metálicos não mudam sua geometria quando são eletrofiados. Por exemplo, Li *et al.* (2013) formaram Nfs de poli(acetato de vinila) (PVA)/quitosana com Nps de prata (Figura 23), obtendo como resultado Nfs na faixa de 130 – 192 nm e Nps de prata entre 15 – 22 nm. Este nanomaterial apresentou atividade antibacteriana, porém é citotóxico frente células de pele humana, provocando irritação e impedindo sua aplicação na liberação controlada de fármacos (LI et al., 2013).

Versões biocompatíveis e aplicadas na liberação controlada de fármacos são reportadas na literatura. Por exemplo, Nfs de PLA contendo Nps de TiO₂ para promover a internalização de daunorubicin em células de leucemia K562, onde o fármaco encontra-se adsorvido na interface das Nps, facilitando a internalização na célula (CHEN et al., 2007). Porém, está

metodologia não protege o fármaco do microambiente ao qual é exposto, impedindo a utilização de fármacos que são facilmente degradados. Uma alternativa é utilizar Nps poliméricas, apresentando alta capacidade de encapsulação comparando com Nps metálicas, porque podem encapsular o fármaco na membrana e no *bulk* do agregado, protegendo o fármaco.

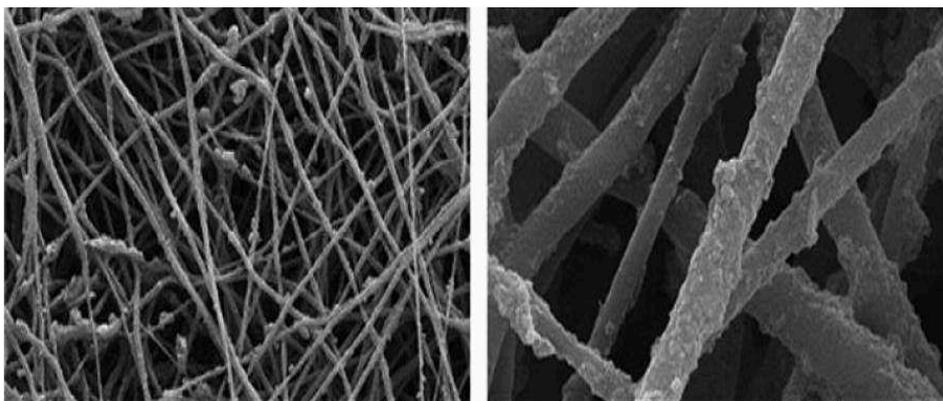
Figura 23. Nanofibras de acetato de polivinila/quitosana com nanopartículas de prata.



Fonte: Adaptada da literatura (LI et al., 2013).

Até a presente data a adsorção de Nps poliméricas em Nfs tem sido pouco explorada. Jung et al. (2015) estudaram a formação de um compósito de Nfs de policaprolactona (PCL) com Nps de quitosana/fucoidan (Figura 24), avaliando o material com ensaios citotóxicos. O nanomaterial não foi citotóxico frente fibroblastos da pele, demonstrando que esses materiais são altamente biocompatíveis e têm grande potencial de aplicação em sistemas curativos e de liberação de fármacos na pele sem apresentar efeitos colaterais (JUNG et al., 2015).

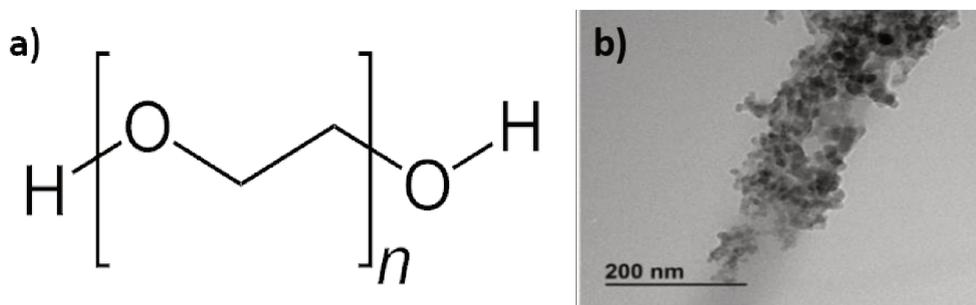
Figura 24. Imagens de SEM de Nfs de policaprolactona com nanopartículas de quitosana/focoidan.



Fonte: Adaptada da literatura (JUNG et al., 2015).

Outro polímero utilizado na formação de Nfs é o poli(óxido de etileno) (PEO) (Figura 25a), este é solúvel em água, biocompatível e biodegradável, sendo ideal para aplicações biológicas (PAKRAVAN; HEUZEY; AJJI, 2012). Yoon (2016) publicou a formação de um compósito formado por nanofibras de PEO e Nps de celulose (Figura 25b). Fotos de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) confirmaram a inserção das Nps nas Nfs, com diâmetro medio ligeiramente maior que as Nfs de PEO (CHEN et al., 2007). No entanto, neste trabalho não foram realizados testes biológicos nem de liberação de compostos ativos.

Figura 25. A) Estrutura química do PEO. b) Nanofibras de PEO com Nps de celulose.



Fonte: Adaptada da literatura (YOON, 2016).

Chen et al. (2012) estudaram a liberação de ácido ribonucleico (RNA) em pH 5,5 e 7,4 de um compósito formado por Nfs de poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) e Nps de quitosana contendo RNA. Os resultados de liberação *in vitro* mostraram que é um processo dependente do pH. A liberação do RNA apresentou um perfil trifásico em ambos os pH. Porém, em pH 7,4 a liberação aconteceu por erosão do *bulk* do sistema (Nfs/Nps), enquanto em pH 5,5 a liberação foi atribuída à erosão do *bulk* e da superfície do nanomaterial (CHEN et al., 2007). Em vista do anterior marco teórico, Nfs formadas por materiais biocompatíveis como PEO e quitosana contendo Nps de CHQ podem ser uma alternativa para aplicá-los no tratamento câncer e/ou quimioterapia local.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é desenvolver dois nanomateriais poliméricos de liberação controlada: i) Nps de CHQ-SDS aplicadas na encapsulação da H3TM04 e posterior avaliação citotóxica em células de câncer de pele e leucemia. ii) Nfs de PEO-quitosana contendo Nps de CHQ-SDS com o H3TM04 encapsulado.

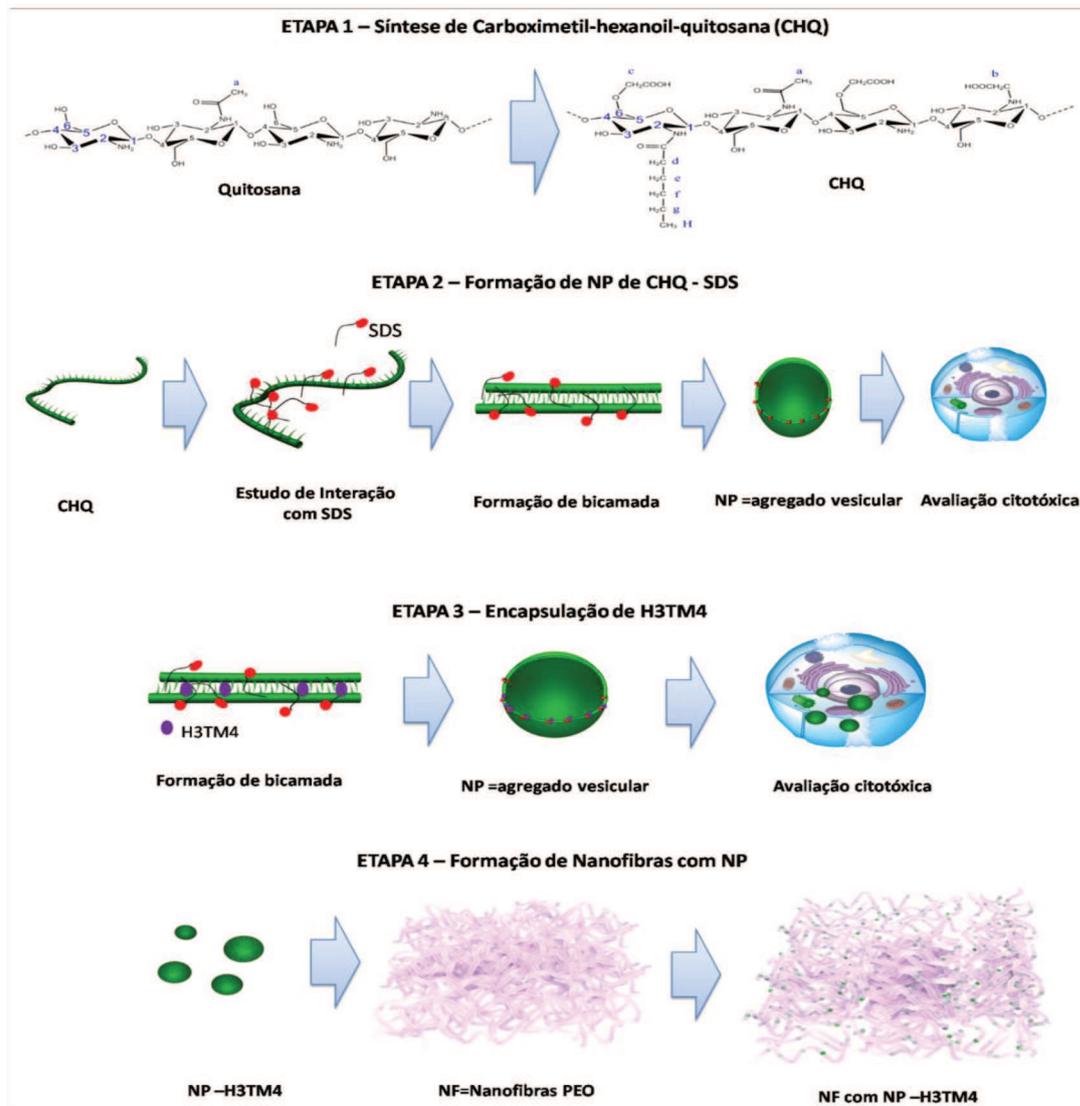
1.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os derivados carboximetil quitosana e hexanoil-carboximetil quitosana.
- Formar e caracterizar agregados e Nps de hexanoil-carboximetil quitosana em pH 7,4 e estudar a interação com SDS.
- Avaliar a citotoxicidade das Nps CHQ em ausência e presença de SDS sobre células leucêmicas K562, Jurkat e de melanoma murino B16F10.
- Determinar a capacidade de encapsulação e liberação *in vitro* da pirazolina nas Nps de hexanoil-carboximetil quitosana/SDS, e posterior avaliação citotóxica em células leucêmicas e de melanoma murino.
- Desenvolver Nfs de PEO-quitosana e caracterizá-las por técnicas de microscopia e análises térmicas.
- Desenvolver um novo material pela dispersão das Nps de hexanoil-carboximetil quitosana/SDS (contendo a pirazolina) sobre Nfs de PEO-quitosana, avaliando o perfil *in vitro* de liberação do H3TM04 encapsulado e sua permeação em pele humana.

1.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Polímeros e Surfactantes (POLISSOL), localizado no Departamento da Química da Universidade Federal de Santa Catarina (DQ/UFSC). O projeto foi desenvolvido em 4 etapas (Figura 26): i) Síntese de CHQ, ii) Formação de Nps de carboximetil-hexanoil-quitosana/SDS (CHQ-SDS), iii) Encapsulação da pirazolina H3TM04 nas Nps CHQ-SDS e iv) Formação de Nfs de PEO-quitosana (PEOCh) com Nps de CHQ-SDS contendo o composto ativo.

Figura 26. Etapas do projeto de doutorado.



Fonte: O autor.

1.3.1 Reagentes

A pirazolina H3TM04 (Figura 3) foi sintetizada pela estudante de graduação Jessica Toigo e cedida pelo Laboratório de Estrutura e Atividade (LEAT). Sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo José Nunes. No anexo A, encontra-se o processo de síntese e características do composto obtido pelo LEAT.

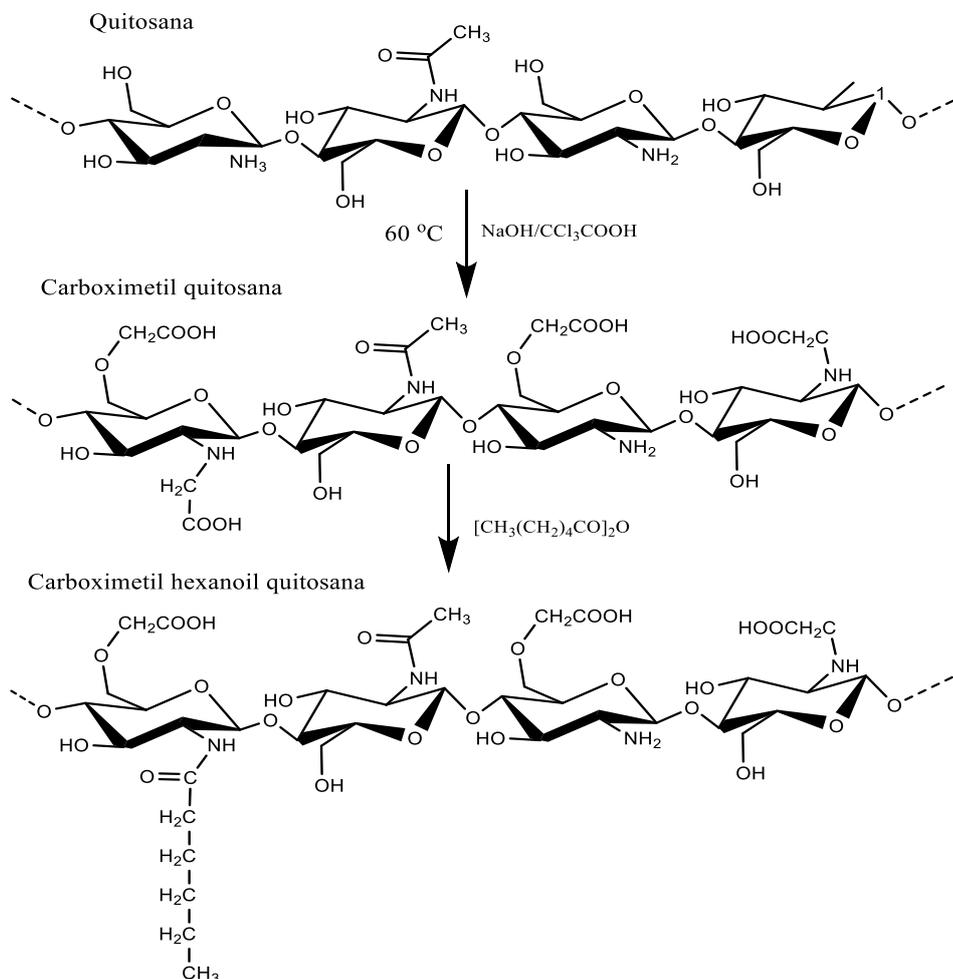
A quitosana (M_w na faixa de 90 até 190 kDa) com grau desacetilação entre 75 – 85%, dodecil sulfato de sódio (SDS) ($\geq 99\%$), 2-propanol ($\geq 99,4\%$), metanol ($\geq 99,8\%$), hidróxido de sódio ($\geq 97\%$), ácido cloroacético ($\geq 99\%$), anidrido hexanoico ($\geq 99\%$), fosfato de sódio monobásico ($\geq 99\%$), fosfato de sódio dibásico ($\geq 99\%$), pireno ($\geq 99\%$), azul de Tripiano (solução 0,4 %), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (98%) e membrana de diálises (massa de corte de 3,5 kDa) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Brometo de potássio (KBr) foi comprado da Shimadzu corporation (Japan). O Meio de cultivo do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI), soro fetal bovino inativado (FBC), penicilina, 4-(2-hidroxyetil) piperazina-1-ácido etanosulfônico (HEPES, $\geq 99,5\%$) foram compradas da (GIBCO®, Brazil). Todos os compostos foram utilizados sem prévia purificação e foi utilizada água Milli-Q na preparação de todas as soluções.

1.3.2 Formação de nanoagregados de CHQ-SDS in solução aquosa.

1.3.2.1 Síntese de CMQ

Foi suspensa 5 g de quitosana em 50 mL de 2-propanol (seco previamente em peneira) a temperatura ambiente por 30 min. Adicionou-se à suspensão resultante 12,5 mL de NaOH ($13,3 \text{ mol L}^{-1}$) e 25 g de ácido cloroacético, com agitação constante durante 4 h a 60 °C. Posteriormente, o material foi filtrado e lavado com metanol frio até o apresentar pH neutro. Secou-se a CMQ durante 5 dias a 20 °C e posteriormente armazenada em dessecador no vácuo (Figura 27).

Figura 27. Proposta da rota sintética da hexanoil carboximetil quitosana (CHQ).



Fonte: O autor.

1.3.2.2 Obtenção de CHQ

Foi dissolvida 2 g de CMQ em água deionizada (50 mL) com agitação constante durante 24 h. Seguido da adição de 50 mL de metanol e anidrido hexanoico ($0,3\text{ mol L}^{-1}$). Depois de 12 h de reação, a amostra foi coletada em membrana de diálises e deixada durante 72 h em solução de etanol (25 % v/v). Logo, após seca durante 5 dias/ $20\text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente armazenada em dessecador no vácuo.

A quitosana, CMQ e CHQ foram caracterizadas por RMN ^1H (Bruker Ascend 400 MHz) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (espectrofotômetro PRESTIGE 21-Shimadzu, Japão). Os espectros de RMN ^1H foram realizados na Central de Análise da Universidade Federal do Rio Grande e os espectros de FTIR foram obtidos no Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (POLIMAT). Para obter o RMN

^1H , dissolveu-se a quitosana em ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$), CMQ e CHQ em D_2O . Os espectros de RMN ^1H foram obtidos a $80\text{ }^\circ\text{C}$ K com supressão de solvente. Já, os espectros de FTIR foram obtidos por pastilha de KBr utilizando 3 mg de cada polímero e 100 mg de KBr; os dados foram adquiridos de 4000 a 500 cm^{-1} numa taxa de 4 cm^{-1} , 20 varreduras foram realizadas para cada amostra.

O grau de acetilação da quitosana (% DA) foi calculado utilizando a equação 15:

$$\%DA = \left(\frac{2 \times A_{CH_3}}{A_{(H_2-H_6)}} \right) \times 100 \quad (15)$$

Onde A_{CH_3} é a área do sinal em 2.1 ppm no espectro de RMN ^1H da quitosana e $A_{(H_2-H_6)}$ é a soma das áreas, no mesmo espectro, correspondentes aos hidrogênios conectados ao carbonos C2-C6 da cadeia hidrocarbônica da quitosana (PEREIRA; MUNIZ; HSIEH, 2015).

O grau de substituição do grupo hexanoil (DS) foi calculado pela equação 16:

$$DS = \frac{A_{CH_3(1.30\text{ ppm})}}{A_{2(3.7\text{ ppm})}/3} \quad (16)$$

Onde $A_{CH_3(1.30\text{ ppm})}$ e $A_{2(3.7\text{ ppm})}$ são as áreas do sinal em 1,30 e 3,7 ppm, respectivamente e correspondem aos hidrogênios metílicos dos grupos hexanoil e os hidrogênios ligados aos átomos de carbono C2 no espectro de RMN ^1H do CHQ (LIU et al., 2006).

O grau de substituição do grupo carboximetil (F) na CHQ foi calculado usando o espectro de RMN ^1H e as seguintes equações (equações 17 a 20).

$$f_6 = (1/2)(A_{(4.4\text{ ppm})} - A_{(5.1\text{ ppm})}) / (A_{(5.4\text{ ppm})} - A_{(3.6\text{ ppm})}) \quad (17)$$

$$f_3 = A_{(5.1\text{ ppm})} / (A_{(5.4\text{ ppm})} - A_{(3.6\text{ ppm})}) \quad (18)$$

$$f_2 = (1/2)(A_{(3,8\text{ ppm})}) / (A_{(5.4\text{ ppm})} - A_{(3.6\text{ ppm})}) \quad (19)$$

$$F = f_6 + f_3 + f_2 \quad (20)$$

Onde f_6 , f_3 e f_2 são a fração de carboximetilação na posição 6-O, 3-O, 2-N, respectivamente. F é a fração total de grupos carboximetil e pode variar de 0 e 2 (CHEN; PARK, 2003; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2014).

1.3.2.3 Medidas de tensão superficial

Tensiometria foi utilizada para determinar os parâmetros de agregação da CHQ e CHQ-SDS. As medidas foram realizadas em um tensiômetro (Kruss GmbH, modelo K8) a $298,15 \pm 0,1$ K com um anel de Pt-Ir-20. Uma solução concentrada de CHQ ou SDS (10 vezes acima da cmc) foi utilizada para titular a solução alvo (tampão fosfato pH 7,4 ou CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão pH 7,4), agitada durante 20 min, para atingir o equilíbrio antes de cada medição (DE MODOLON et al., 2009).

1.3.2.4 Medidas de condutividade

A condutividade específica (κ) foi determinada utilizando um condutivímetro digital (950, Bante instruments) a 298,15 K, previamente calibrado com solução padrão de KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (Bante instruments). As soluções de CHQ ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ até 4 mg mL^{-1}) foram preparadas em tampão pH 7,4. A solução de polímero (15 mL) foi colocada em uma jaqueta de vidro (com fluxo constante de água, 298,15 K) e titulada com a solução de SDS (10 vezes acima da cmc) utilizando uma seringa (Hamilton, $50 \mu\text{L}$) com agitação constante.

1.3.2.5 Medidas de Fluorescência

A emissão fluorescência do pireno foi utilizada para investigar a interação CHQ-SDS em um espectrômetro de fluorescência (Hitachi F4500), usando uma cela de quartzo de 10 mm de comprimento (trajetória horizontal). A concentração final de pireno na solução de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de CHQ (em tampão pH 7,4) foi fixada em $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As configurações da largura da fenda de ambos os monocromadores (excitação e emissão) foram ajustadas em 5 nm. O pireno foi excitado em 335 nm e os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos de 350 a 420 nm. A polaridade da sonda é expressa pela relação I_1/I_3 , onde I_1 e I_3 são as intensidades de fluorescência da primeira (372,5 nm) e terceira banda vibrônicas (383,5 nm) do espectro de

emissão de fluorescência do pireno. A razão (I_1/I_3) foi calculada em diferentes concentrações de SDS (0 a 5 mmol L⁻¹).

1.3.2.6 Medidas de DLS e potencial zeta

O tamanho dos agregados de CHQ e CHQ-SDS em diferentes concentrações foram determinados por DLS (goniômetro ALV CGS-3-correlador multi-tau) com laser linear polarizado vermelho de hélio-néon 35 mW ($\lambda = 632,8$ nm). As amostras foram previamente filtradas (filtro de celulose 0,45 μ m, Chromafil), posteriormente armazenadas em celas de vidro de 10 mm de diâmetro e analisadas em vários ângulos de espalhamento (30 a 145°) a 298,15 K. Para obter a função de autocorrelação ($g^{(1)}(q,t)$), foram analisadas as flutuações da luz espalhada pelo software ALV-correlator V.3.0. A função de distribuição do tempo de decaimento ($A(\tau)$) e a função de distribuição do tamanho ($A(R_H)$) foram obtidas pela análise da $g^{(1)}(q,t)$, pelo método CONTIN. O R_H das Nps (R_H^{Np}) e os agregados (R_H^{agg}) foram calculados utilizando a equação de Stokes-Einstein (equação 6). As medidas de DLS foram realizadas na condição de diluição infinita, por tanto foi utilizada a viscosidade da água na temperatura de trabalho para calcular os valores de R_H . As medições do potencial zeta foram realizadas em um equipamento Zetasizer ZS (Malvern) a 298,15 K utilizando celas de eletroforese capilar.

1.3.2.7 Medidas de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Com o objetivo de obter as alterações entálpicas associadas às interações CHQ-SDS, medidas de ITC foram realizadas. Estas foram realizadas em um microcalorímetro (TAM III), da TA instruments (USA), controlado pelo software TAM assistantTM. As medidas foram realizadas a temperatura constante (298,1500 \pm 0,0001 K) e consistiu na adição de 50 injeções de 10 μ L de uma solução concentrada de SDS (19 mmol L⁻¹ - 14 vezes acima o valor da cmc) com uma seringa Hamilton (500 μ L), a qual é controlada por uma bomba de seringa 3810 (TA Instruments). A solução é adicionada em uma cela calorimétrica que contém a amostra (2,70 mL de tampão ou 0,05 mg mL⁻¹ da solução de CHQ). A cânula da seringa foi imersa na cela da amostra 180 minutos antes de iniciar a titulação. O intervalo entre as injeções foi de 30 minutos (tempo suficiente para o sinal retornar à linha de base) e agitação constante da amostra presente na cela, a 180 rpm (3,0 s⁻¹), por meio de um agitador de ouro com formato helicoidal.

1.3.3 Nanopartículas de carboximetil-hexanoil quitosana / dodecil sulfato de sódio

1.3.3.1 Formação e caracterização das Nps de CHQ-SDS

As Nps com (CHQ-SDS-H) e sem (CHQ-SDS) pirazolina foram formadas utilizando o seguinte método: CHQ (1 mg mL^{-1}) foi suspenso em SDS(aq) 6 mmol L^{-1} (Previamente preparado em tampão fosfato pH 7,4) sob agitação constante a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 36 h. A amostra de CHQ-SDS foi submetida a sonicação por 20 min (20 W), utilizando uma sonda de ultrassom (UP200S, Hielscher). A sonicação foi realizada em banho de gelo-água para evitar a evaporação do solvente. As CHQ-SDS-H foram obtidas utilizando o mesmo método, mas foi adicionado $360 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução da pirazolina H3TM04 10 mmol L^{-1} em acetonitrila durante a etapa de sonicação. Posteriormente, as nanopartículas foram armazenadas no escuro a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

O tamanho e a carga superficial de CHQ-SDS-H e CHQ-SDS foram determinadas por DLS e potencial zeta, utilizando a mesma metodologia reportada no item 4.2.6. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A morfologia da Nps sem pirazolina foi avaliada por TEM 100 kV (JEM-1011); para isso, uma gota da dispersão foi colocada no *grid* de carbono – cobre, e o excesso de solução foi removido com papel filtro. Posteriormente, adição de uma gota de acetato de uranil (0,1% m/v), o qual atua como marcador das Nps. A amostra foi deixada em repouso durante 24 h a temperatura ambiente e logo analisada no TEM 100 kV.

1.3.3.2 Eficiência de encapsulação

As Nps formadas no item 4.3.1 foram centrifugadas (1000 rpm) durante 5 min para remover o H3TM04 insolúvel. Logo, as CHQ-SDS-H foram separadas por centrifugação (15000 rpm) e suspendida numa solução ácida (pH 4,5) com agitação constante durante 3 h. A suspensão resultante foi misturada com acetonitrila com agitação constante durante 3 h. A concentração de H3TM04 foi determinada usando uma curva de calibração de padrão externo por espectroscopia de fluorescência (Hitachi F4500). As configurações da largura da fenda de excitação e emissão foram ajustadas para 5 nm. A amostra foi excitada a 300 nm e os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos entre 320 a 520 nm. O experimento foi realizado em triplicata. A quantidade total de H3TM04 foi determinada usando a mesma metodologia. A porcentagem de eficiência de encapsulação do H3TM04 nas Nps ($\% \text{ EE}_{\text{Nps}}$) foi calculada a partir da seguinte equação (equação 21):

$$\% EE_{Nps} = \frac{\text{Quantidade de H3TM04 encapsulada}}{\text{Quantidade total de H3TM04}} \times 100 \quad (21)$$

A % EE_{Nps} foi corroborado pela quantificação do teor total de H3TM04 nas Nps e no sobrenadante após ultrafiltração/centrifugação das Nps utilizando dispositivos de centrifugação Amicon, com membrana Ultracel-100 (com corte de 100 kDa, Millipore Corp.).

1.3.3.3 Localização do H3TM04 nas nanopartículas

Devido às suas características auto fluorescentes, a emissão de fluorescência do H3TM04 foi utilizada como sonda para investigar a polaridade do microambiente das Nps de CHQ-SDS-H formadas. misturas de água / dioxano foram preparadas de acordo com o relatado por Ramakanta Mondal et al. Uma solução estoque H3TM04 a 0,01 mol L⁻¹ foi preparada em dioxano. A solução estoque foi diluída 10 vezes para obter soluções de H3TM04 com concentração de 0,001 mol L⁻¹ em diferentes misturas de água / dioxano (% dioxano (v / v) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90) e posteriormente foi determinado os espectros de fluorescência com as mesmas condições de análise reportadas no item 4.3.2 deste capítulo. O comprimento de onda com maior intensidade de emissão do H3TM04 (λ_{EM}^{Max}) em cada proporção de solvente foi correlacionado com o valor da energia de transição E_T(30) já reportada na literatura (MONDAL; GHOSH; MUKHERJEE, 2016). Já as amostras de CHQ-SDS-H e CHQ-H foram preparadas com a metodologia reportada no item 4.3.1.

1.3.3.4 Perfil e cinética de liberação *in vitro* do H3TM04

Os estudos de liberação foram realizados utilizando membrana de diálise (massa molecular de corte de 3,5 kDa) e um aparelho de dissolução USP a 37 ± 1 °C e agitação mecânica constante (75 rpm). Com o objetivo de atingir as condições *sink*, foi utilizado como meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 com SDS 0,5% (m/v). Suspensões de CHQ-SDS-H (1200 μmol L⁻¹ de H3TM04) em pH 7,4 e da pirazolina H3TM04 em acetonitrila na mesma concentração presentes nas nanopartículas, foram adicionadas em membranas de diálise. Alíquotas do meio de liberação (5 mL) foram removidas em diferentes intervalos de tempo durante 72 h e quantificada a concentração de H3TM04 por espectroscopia de emissão de

fluorescência utilizando uma curva de calibração de padrão externo em SDS 0,5% (m/v). Após coletar cada amostra, o meio de liberação é imediatamente substituído. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Para avaliar a cinética de liberação e o mecanismo de liberação, quatro modelos cinéticos foram utilizados para interpretar os dados de liberação do H3TM04: Zero Ordem, pseudo-primeira ordem, modelo de Higuichi e modelo lei de potência (equações 22 a 25) (MURTH, SUVAKANTA NARASIMHA; NATH; PRASANTA, 2010):

Zero ordem:

$$M_t/M_\infty = k_0 t \quad (22)$$

Pseudo-primeira ordem:

$$M_t/M_\infty = 1 - e^{(-k_1 t)} \quad (23)$$

Modelo de Higuichi:

$$M_t/M_\infty = k_H t^{\frac{1}{2}} \quad (24)$$

Modelo da lei de potência

$$M_t/M_\infty = k t^n \quad (25)$$

Onde M_t/M_∞ é a fração de H3TM04 liberada no tempo t . k_0 , k_1 , k_H e k são as constante de liberação Zero Ordem, pseudo-primeira ordem, modelo de Higuichi e modelo lei de potência, respectivamente. As constantes de liberação e os parâmetros dos modelos aplicados foram calculados pelo plote e ajuste dos dados de liberação.

1.3.3.5 Ensaio da atividade antitumoral

1.3.3.5.1 Cultura celular de células leucêmicas

Células de leucemia mielóide aguda (K-562) e uma leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) foram utilizadas neste estudo. Ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao do *Centro de Investigación de Câncer da Universidad de Salamanca*. As células foram cultivadas no meio do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI), o qual foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 10 mmol L⁻¹ de HEPES sob atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C em frascos de 25 cm² e 75 cm². A viabilidade celular foi avaliada pelo

ensaio de exclusão azul de Tripano (0,5 m/v) e apenas amostras com > 95% de viabilidade celular foram utilizadas.

1.3.3.5.2 Ensaio de viabilidade (MTT) e avaliação morfológica do apoptose

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Onde a densidade óptica dos grupos controle (células não tratadas) foram considerados como 100% de células viáveis. Para obter a curva concentração/tempo de viabilidade celular, as células K-562 e Jurkat (5×10^4 células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações (5-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de H3TM04 (com CHQ-SDS-H) por 24, 48 e 72 h. Onde, adicionou-se um volume máximo de 20 μL dos compostos, Nps, e/ou CHQ às células. o mesmo volume de solvente foi adicionado aos poços controle sem tratamento. Posteriormente, foi avaliada a viabilidade celular e os valores de concentração inibitória 50% (IC_{50}) foram calculados usando o software GraphPad Prism 5.

A morte apoptótica foi verificada por microscopia de fluorescência (Leica DM5500 B). As células K-562 e Jurkat (5×10^4 células/poço) foram incubadas com e sem CHQ-SDS-H no valor da IC_{50} durante 24 h. As células foram lavadas com PBS e tratadas com 40 μL de laranja de acridina (10 mg mL^{-1}) e brometo de etídio (5 mg mL^{-1}). Seguidamente, as amostras foram pingadas numa lâmina de vidro e analisadas no microscópio de fluorescência. Neste ensaio, as células viáveis exibem uma fluorescência verde (marcação do laranja de acridina), enquanto as células apoptóticas exibem uma fluorescência laranja-vermelho (marcação do brometo de etídio).

1.3.4 Nanofibras de PEO-quitosana contendo nanopartículas de carboximetil-hexanoil quitosana/dodecil sulfato carreando a pirazolina H3TM04 para câncer de pele.

1.3.4.1 Produção de nanofibras

Três tipos de Nfs foram formadas: i) Blenda de PEO e quitosana (PEOCh), ii) Blenda de PEO, quitosana e H3TM04 (PEOCh-H3) e iii) Blenda de PEO, quitosana e CHQ-SDS-H (PEOChNp). Para isso, soluções de PEO (8% m/m) e quitosana (5% m/m) foram preparadas separadamente em água Milli-Q e ácido acético 1 mol L^{-1} , respectivamente. As soluções se mantiveram sobre agitação constante à temperatura ambiente, durante 24 h. Logo, as soluções de PEO e quitosana foram misturadas para se obter uma blenda com (4% m/m) de PEO e (1%

m/m) de quitosana (PEOCh). Para preparar o sistema PEOCh-H3, H3TM04 ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$, em acetonitrila) foi adicionado sob agitação na blenda polimérica ii. Finalmente, o sistema PEOChNp foi formado pela dispersão de CHQ-SDS-H (1 mg mL^{-1}) na mistura polimérica. A metodologia para formar CHQ-SDS-H, caracterização e a eficiência de encapsulação foi relatada na seção 4.3. Para o processo de eletrofiação, as amostras foram inseridas em seringas de 5 mL, a uma distância de 13 cm do coletor estático. Utilizou-se uma taxa de $0,1 \text{ mL h}^{-1}$ e uma voltagem de 8,0 kV nos experimentos. As Nfs foram coletadas em papel-pergaminho e durante a coleta a umidade da sala de trabalho foi mantida entre 40 a 45% utilizando desumidificadores (ARSEC - 200M3-U).

1.3.4.2 Morfologia das nanofibras

A morfologia e a distribuição do diâmetro das Nfs foram avaliadas usando um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FEG-SEM) (JEOL JSM-6701F). As Nfs foram coletadas em papel alumínio, montadas em *stubs* de alumínio e revestidas com uma camada ultrafina de ouro. A distribuição de tamanho foi determinada usando o software de processamento de imagens Image-J (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). A morfologia dos Nfs também foi avaliada por TEM, operando a 100 kV, onde as Nfs foram coletadas diretamente sobre o gride de cobre. A morfologia superficial e a estrutura topográfica das Nfs foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM) (Nanosurf FlexAFM) usando uma ponta TAP190Al-G com raio menor que 10 nm, uma frequência de ressonância de 190 kHz, constante da mola de 48 N/m e velocidade de varredura de 1 linha/s. As imagens foram analisadas com o software *Scanning Probe Microscopy Software* (HORCAS et al., 2007). O ângulo de contato foi determinado pelo método *Kruss Easy Drop* usando um goniômetro (ramé-Hart-250). Nfs (2 cm x 2 cm) foram fixadas numa lâmina de vidro. Uma gota de água é pingada na superfície de Nfs usando uma microseringa ($50 \mu\text{L}$). O ângulo de contato foi medido 10 vezes para cada Nf a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As imagens das gotas sob as Nfs foram obtidas utilizando uma câmera digital de alta velocidade (NeT GMBH 1394) e o ângulo de contato foi determinado utilizando o software *Drop imagem 2.4.05*.

1.3.4.3 Caracterização das nanofibras

A caracterização química das Nfs, PEO, quitosana e H3TM04 foi avaliada por FTIR utilizando a mesma metodologia reportada na seção 4.2.2. A análise termogravimétrica (TGA)

das Nfs foi realizado utilizando uma termobalança (TGA-50, Shimadzu). PEO puro, quitosana e as Nfs foram pesadas (5-10 mg) e aquecidas desde a temperatura ambiente até 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo constante de nitrogênio (50 mL min⁻¹). Os resultados foram avaliados por meio da primeira derivada do termograma obtido. Por último, medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (DSC-50, Shimadzu) foram realizadas. Onde, 5 mg de cada amostra foram aquecidos de -100 °C até 250 °C, a uma taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹.

1.3.4.4 Eficiência de encapsulação de H3TM04 nas nanofibras

PEOCh-H3 e PEOChNp Nfs foram dissolvidas em 2 mL de água a pH 4,5 sob agitação constante durante 24 h para dissolver as Nfs. Posteriormente, 3 mL de acetonitrila foram adicionados e o sistema manteve-se sob agitação constante durante 3 dias. A concentração de H3TM04 nas Nfs foi determinada por espectroscopia de emissão de fluorescência usando o método descrito na seção 4.3.2. As medidas foram realizadas em triplicata, e a porcentagem de eficiência de encapsulação nas nanofibras (% EE_{Nfs}), foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% EE_{Nfs} = \frac{\text{Quantidade de H3TM04 nas Nfs}}{\text{Quantidade teorica}} \times 100 \quad (26)$$

1.3.4.5 Perfil e cinética de liberação *in vitro* do H3TM04 das nanofibras

PEOCh-H3 e PEOChNp Nfs (100 mg) foram suspensas em 2 mL de PBS pH 7,4 e posteriormente adicionadas em membranas de diálise. As amostras foram mantidas a 37 °C num banho termostático com agitação constante, onde, o meio de liberação utilizado foi tampão PBS com SDS 0,5% m/v para atingir as condições *sink*. Alíquotas (0,5 mL) do meio de liberação foram removidas em diferentes intervalos de tempo durante seis dias e a concentração de H3TM04 foi quantificada por espectroscopia de emissão de fluorescência utilizando uma curva de calibração de padrão externo, em SDS 0,5% m/v. O meio de liberação foi imediatamente substituído, após cada coleta. Os experimentos foram realizados em triplicata. O mecanismo de liberação foi avaliado utilizando os modelos cinéticos reportados na seção 4.3.3.

1.3.4.6 Ensaio de permeação em pele humana

1.3.4.6.1 Preparação das amostras de pele humana

A pele humana foi obtida de cirurgias abdominais em um hospital local, sob doação anônima e aceita pelo comitê de ética (protocolo, CAE: 87349418.7.0000.0121). A pele foi coletada em tampão Krebs (pH 7,4) imediatamente após a cirurgia. Em seguida, as amostras de pele foram preparadas por remoção do tecido adiposo, colocadas em folhas de papel alumínio e armazenadas a -20°C até serem utilizadas. Antes da utilização, as peles foram descongeladas em tampão PBS durante 30 minutos.

1.3.4.6.2 Experimentos com células de difusão por fluxo

A membrana da pele foi firmemente colocada entre o compartimento doador e aceitador da cela de difusão de Franz, com uma área de superfície de $1,77\text{ cm}^2$. O sistema foi mantido sob temperatura controlada ($37 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e agitação constante. $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de H3TM04 foram aplicados no compartimento doador. O H3TM04 foi administrado por meio de uma solução de propilenoglicol (H3TM04 livre) e numa suspensão de CHQ-SDS-H. O compartimento do receptor, foi preenchido com uma mistura de tampão PBS: etanol (70:30). Amostras deste fluido foram retiradas em intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas para estimar a quantidade de H3TM04 permeado. Após 7 horas, a pele foi removida da cela de Franz, limpada com um cotonete umedecido com água Milli-Q e cortada em pequenos pedaços. Em seguida, o H3TM04 foi extraído com acetonitrila por sonicação (banho de ultrassom), durante 30 min. Posteriormente, a concentração de H3TM04 foi determinada por espectroscopia de fluorescência no fluido receptor, como também na membrana da pele.

1.3.4.6.3 Análise de permeação em pele por microscopia de fluorescência

Imagens de microscopia de fluorescência da pele foram registradas após tratamento com H3TM04 em propilenoglicol, CHQ-SDS-H, PEOCh-H3 e PEOChNp. Pele não tratada foi utilizada como controle. O ensaio de permeação foi realizado sob as mesmas condições experimentais descritas na seção 4.4.6.2. Após 7 horas, as peles foram limpas, montadas com Tissue-tec O.C.T.® (Sakura Finetechnical, Tóquio, Japão) num suporte de amostra metálico e congelado a -20°C . Utilizou-se um criostato (Leica CM 1850, Nussloch, Alemanha) para cortar

fatias verticais de 20 μm de espessura, que foram submetidas a microscopia de fluorescência utilizando um Microscópio Invertido Olympus IX83 com excitação por laser, a 350 nm.

1.3.4.7 Cultura celular de melanoma e ensaio de viabilidade celular

Células de melanoma murino B16F10 (Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) e utilizadas para avaliar o efeito das CHQ-SDS na capacidade citotóxica do H3TM04. Nesta etapa foi utilizado a mesma metodologia de suplementação celular, determinação e cálculo da viabilidade celular reportado nas seções 4.3.4.1 e 4.3.4.2.

CAPÍTULO II

2 FORMAÇÃO DE NANOAGREGADOS DE CARBOXIMETIL HEXANOIL QUITOSANA / DODECIL SULFATO DE SÓDIO EM SOLUÇÃO AQUOSA

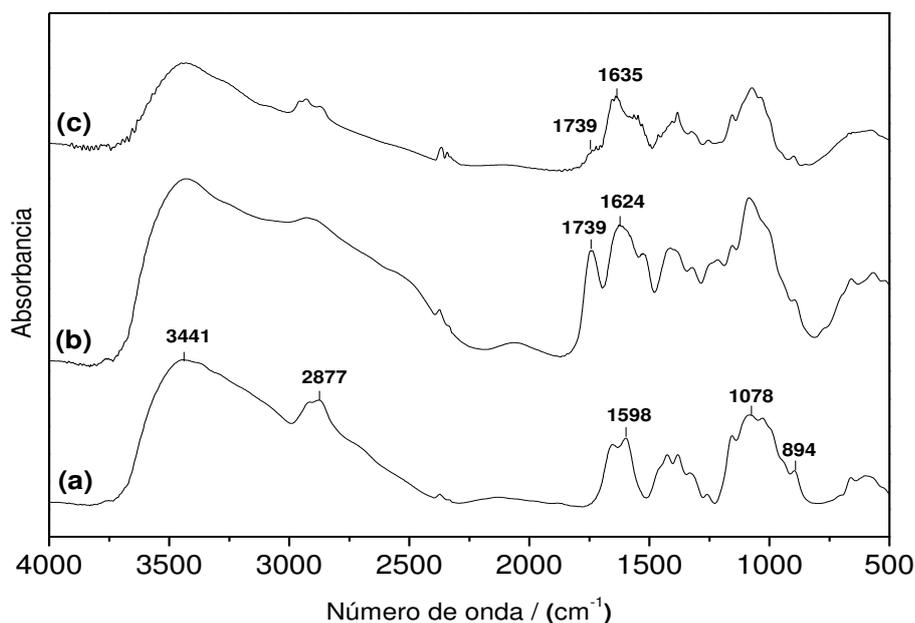
Neste capítulo, será apresentada a caracterização da quitosana, CMQ e CHQ por RMN ^1H e FTIR. Como também, será discutido o processo de agregação da CHQ em ausência e presença de SDS por meio de parâmetros de agregação (cac, cmc e psp) e parâmetros termodinâmicos de agregação ($\Delta G_{\text{cac}}^{\circ}$, $\Delta G_{\text{psp}}^{\circ}$, $\Delta \Delta G_{\text{agg}}^{\circ}$ e ΔH_{agg}). Além disso, o efeito da concentração no tamanho, na estabilidade cinética e na carga superficial dos nanoagregados de CHQ-SDS foi avaliada por DLS e potencial zeta, com o objetivo de conhecer as características físico-químicas do sistema CHQ-SDS e aprofundar o conhecimento científico associado às misturas binárias polissacarídeos hidrofobicamente modificados/surfactantes aniônicos, visando o trabalho na modulação e no controle das nanoestruturas formadas.

Publicação: Aggregation behavior of self-assembled nanoparticles made from carboxymethyl-hexanoyl chitosan and sodium dodecyl sulphate surfactant in water, *Journal of molecular liquids*, 278 (2019) 253-261.

2.1 Caracterização de quitosana, carboximetil quitosana e carboximetil hexanoil quitosana

Quitosana, CMQ e CHQ foram caracterizadas por FTIR e RMN ^1H . A Figura 28 apresenta todos os espectros de FTIR obtidos. A Figura 28a, mostra as bandas características da quitosana; sobreposição das bandas de estiramento axial da ligação O-H e de estiramento N-H centrada em 3441 cm^{-1} , estiramento do C-H em 2877 cm^{-1} , estiramento axial da amida secundária (C-N) em 1598 cm^{-1} , e as bandas em 1078 cm^{-1} e 894 cm^{-1} atribuídas à deformação C-O-C e das estruturas polissacarídicas, respectivamente (LIN et al., 2011). As mesmas bandas características da quitosana são observadas no espectro da CMQ (Figura 28b), como também podem se observar as bandas da deformação dos grupos C=O em 1739 cm^{-1} e N-H em 1624 cm^{-1} , demonstrando a presença do grupo carboximetila no derivado.

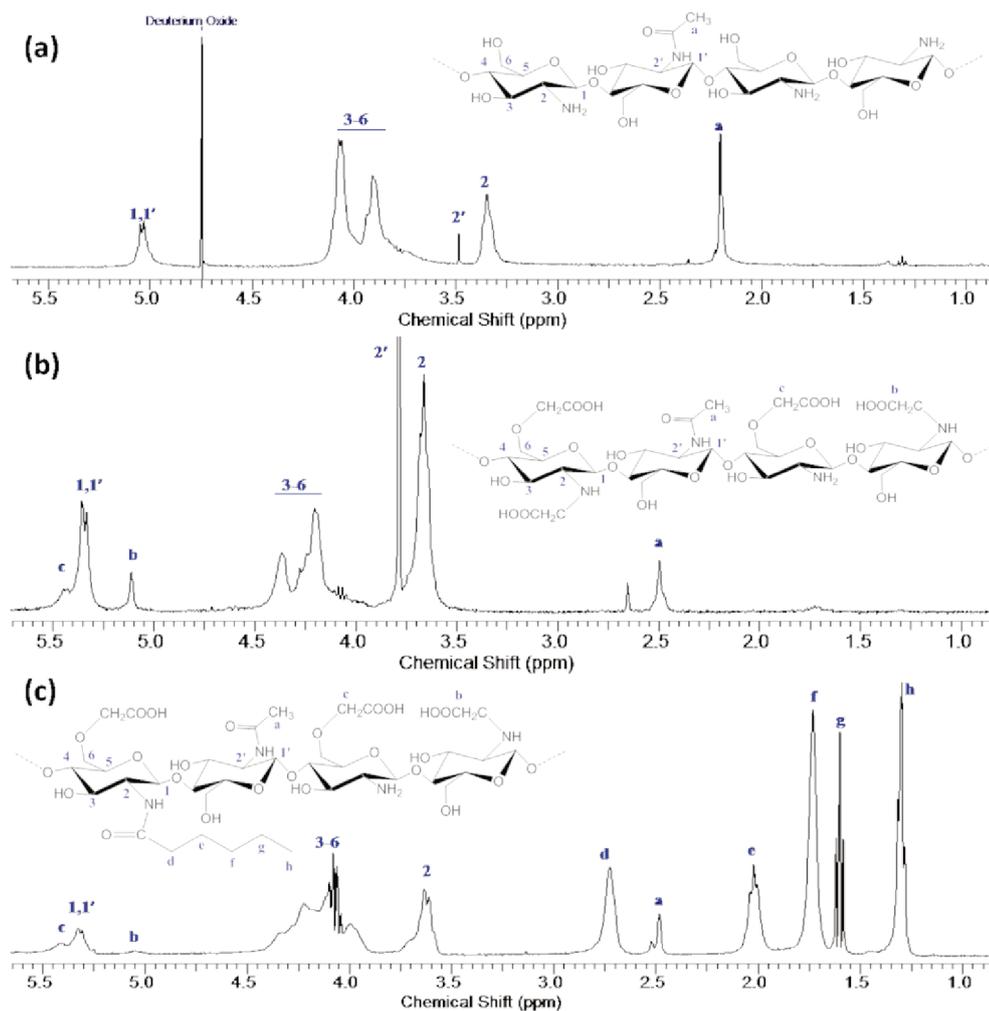
Figura 28. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da (a) quitosana; (b) carboximetil quitosana e (c) carboximetil hexanoil quitosana.



O espectro de FTIR da CHQ (Figura 28c) apresenta as mesmas bandas da CMQ, indicando que os grupos carboximetila permanecem na estrutura hidrocarbônica após a inserção do grupo hexanoil na CMQ. Porém, estes resultados não concluem se aconteceu a inserção do grupo hexanoil no grupo amino da quitosana. Com o objetivo de obter mais informação

estrutural dos derivados, foram realizadas análises de RMN ^1H . A Figura 29, mostra os espectros de RMN ^1H para a quitosana, CMQ e CHQ a 80 °C. Os espectros da CMQ e da CHQ foram obtidos com supressão de solvente.

Figura 29. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) a 80 °C da (a) quitosana; (b) carboximetil quitosana e (c) carboximetil hexanoil quitosana. Os espectros b e c foram obtidos por supressão de solvente.



A Figura 29a mostra o espectro de RMN ^1H da quitosana a 80 °C. O sinal em 2,1 ppm é atribuído aos hidrogênios metílicos dos grupos acetamida, os sinais em 3,3 e 3,4 ppm são atribuídos aos hidrogênios do carbono C2 da unidade glucosamina e aos hidrogênios ligados à unidades glucopiranoose, respectivamente (LIU et al., 2006). Os sinais sobrepostos entre 3,7 a 4,2 ppm correspondem a hidrogênios ligados aos carbonos C3-C6 na unidade glucopiranoose, enquanto a sobreposição na faixa de 4,9 - 5,1 ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C1. O % DA da quitosana foi de 25,8% (calculado pela equação 15).

De acordo com o RMN ^1H da CMQ (Figura 29b), os sinais a 5,1 e 5,4 ppm foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos carboximetil nas posições N e O da quitosana, respectivamente. Estes resultados corroboram as bandas obtidas da CMQ por FTIR. O RMN ^1H da CHQ (Figura 29c) apresenta os sinais referentes aos grupos hexanoil; 1,30 ppm ($\text{C}_\text{h}\text{H}_3$), 1,60 ppm ($\text{C}_\text{g}\text{H}_2$), 1,75 ppm ($\text{C}_\text{f}\text{H}_2$), 2,0 ppm ($\text{C}_\text{e}\text{H}_2$) e 2,75 ppm ($\text{C}_\text{d}\text{H}_2$). Os mesmos deslocamentos químicos foram obtidos por Ying Liu et al. (LIU et al., 2006). O % DS e F foram calculados usando as equações 16 – 20. Onde, os valores do % DS e F foram 51,60% e 0,96, respectivamente.

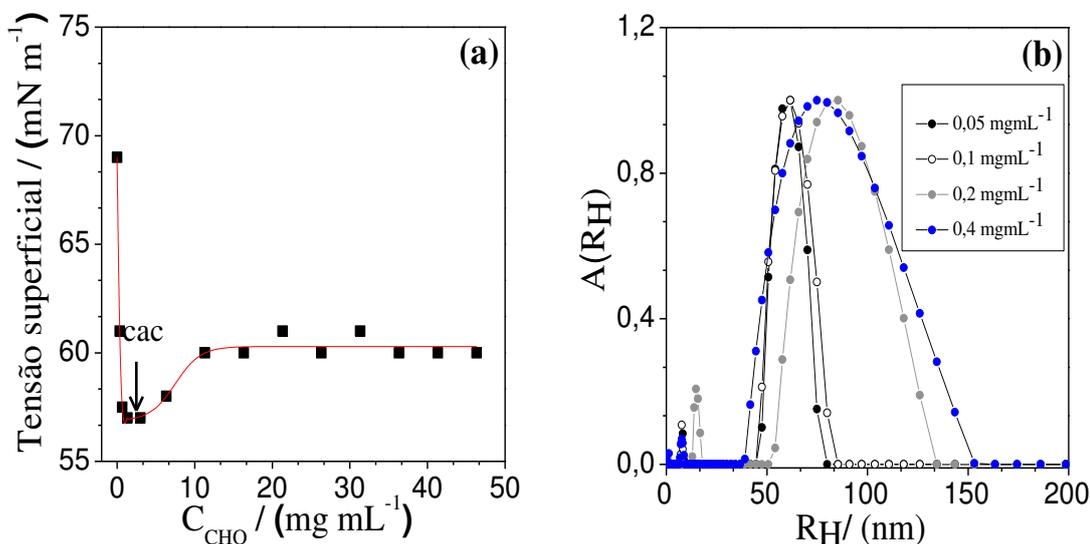
2.2 Formação dos agregados de CHQ

As inserções dos grupos carboximetil e hexanoil na quitosana, conferem-lhe atividade superficial e capacidade de autoagregação em solução aquosa. Tensiometria tem sido amplamente usada para avaliar o comportamento de polímeros em interfaces líquido/gás. Assim como também, para obter a cac, que é a concentração mínima necessária para que aconteça a formação espontânea de agregados de CHQ em solução aquosa por meio interações intra e/ou intermoleculares (ONESIPPE; LAGERGE, 2008a). A figura 30a expõe o comportamento da γ de soluções com diferentes concentrações de CHQ a 298,15 K pH 7,4.

A γ do tampão fosfato pH 7,4 é 70 mNm^{-1} . Com o incremento da concentração de CHQ, a γ diminui rapidamente de 70 mNm^{-1} para 56 mNm^{-1} pelo processo de adsorção da CHQ na interface líquido/gás até a cac $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (saturação energética da interface). O valor da cac obtido neste trabalho é consistente com o valor da literatura, o qual foi obtido por espectroscopia de fluorescência (LIU et al., 2008). Posteriormente, a tensão interfacial aumenta ligeiramente até 60 mN m^{-1} e mantém-se constante com o aumento da concentração da CHQ.

A dissolução de grupos hidrofóbicos de polímeros requer energia para separar as ligações de hidrogênio das moléculas de água. Assim, a transferência de unímeros de CHQ da interface para o *bulk* da solução resulta num incremento da energia livre de Gibbs da superfície do sistema. O valor mínimo da γ na figura 30a (56 mN m^{-1} , perto de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) é provavelmente pela alta disparidade em ambas massas molares (da amostra) e HLB (balanço lipofílico-hidrofílico), devido aos diferentes graus de substituição na CHQ.

Figura 30. a) Isoterma de adsorção de CHQ em tampão fosfato pH 7,4 a 298,15 K. (b) Distribuição da função de tamanho $A(R_H)$ dos agregados de CHQ em diferentes concentrações ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ – $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) e ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K. A distribuição rápida e lenta é atribuída aos unímeros e agregados de CHQ, respectivamente.



Essas cadeias hidrocarbônicas têm diferentes coeficientes de partição entre a interface e o *bulk* do sistema. Na *cac*, agregação das cadeias hidrocarbônicas pode ocorrer na fase aquosa. Inicialmente, só as moléculas com maior solubilidade na água (mais hidrofílica) estão disponíveis para formar agregados. Assim, algumas das moléculas mais hidrofóbicas da CHQ que estavam na interface, podem entrar no *bulk* do sistema e formar agregados. Logo, a γ incrementa rapidamente, até atingir seu valor de equilíbrio. Este comportamento, é similar ao reportado por Cristel Onesippe e Serge Lagerge (ONESIPPE; LAGERGE, 2008b), para a quitosana hidrofobicamente modificada. Em concentrações de CHQ superiores à *cac*, os monômeros de CHQ acumulam-se no *bulk* da solução para formar agregados e não incrementar a energia livre de Gibbs do sistema. Portanto, há um equilíbrio dinâmico entre os agregados da CHQ e seus monômeros em solução aquosa.

Com o objetivo ter uma maior compreensão do processo de agregação da CHQ em solução aquosa, o efeito da concentração da CHQ sobre o raio hidrodinâmico dos agregados (R_H^{agg}) da CHQ foi avaliada por DLS. Esta é uma técnica rápida, com a capacidade de fornecer uma estimativa do tamanho médio de um conjunto de partículas em suspensão na faixa nanométrica. A figura 30b apresenta o efeito da concentração da CHQ sobre a distribuição do R_H^{agg} no ângulo de espalhamento de 90° a 298,15 K. As concentrações de CHQ avaliadas apresentam uma distribuição bimodal de tamanho e de tempo de decaimento (Figura.S1, anexo A). *i.e.* Distribuição com dois modos de relaxamento. Este comportamento bimodal foi

reportado por Evgeniya V. Korchagina e Olga E. Philippova para a dodecil quitosana, com 4% de grau de substituição do grupo dodecil, onde o modo rápido atribuíram aos unímeros de dodecil quitosana, com raio hidrodinâmico dos unímeros (R_H^{uni}) entre 3 – 18 nm e o modo lento foi atribuído aos agregados de dodecil quitosana com R_H^{agg} entre 132 – 134 nm (KORCHAGINA; PHILIPPOVA, 2012). Considerando que os modos lentos e rápidos correspondem aos unímeros e agregados de CHQ, respectivamente, a amplitude da distribuição dos R_H^{agg} (Figura 30b) incrementa com o incremento da concentração de CHQ, indicando que as interações interpartículas muda de repulsão para atração (KORCHAGINA; PHILIPPOVA, 2010, 2012).

Com o objetivo de formar nanoagregados de CHQ para encapsular moléculas hidrofóbicas, é importante avaliar o efeito da concentração de CHQ sobre o raio hidrodinâmico real dos agregados ($R_H^{agg_{real}}$). Assim, foram realizadas medidas de DLS em diferentes ângulos de espalhamentos (variando de 30° até 140°), permitindo realizar gráficos da taxa de relaxação ($\Gamma = 1/\tau$, onde τ é o tempo de relaxação) em função do vetor de espalhamento ao quadrado (q^2) para o modo de relaxação lento (Figura S2, anexo A). O coeficiente de difusão real dos agregados ($D^{agg_{real}}$) foi calculado utilizando a inclinação da curva, onde o $D^{agg_{real}}$ é o resultado das interações polímero–polímero das cadeias hidrocarbônicas inter- e/ou intramolecularmente. O intercepto do gráfico Γ vs q^2 é a origem, indicando que a relaxação do agregado polimérico acontece por difusão translacional. *i.e* cumpre a relação matemática $\Gamma = D^{agg_{real}} * q^2$. O valor absoluto do $D^{agg_{real}}$ diminui com o incremento da concentração de CHQ (Figura S3, anexo A), confirmado a hipótese que a interações interpartícula muda de repulsão para atração promovendo a ampliação da distribuição do R_H^{agg} .

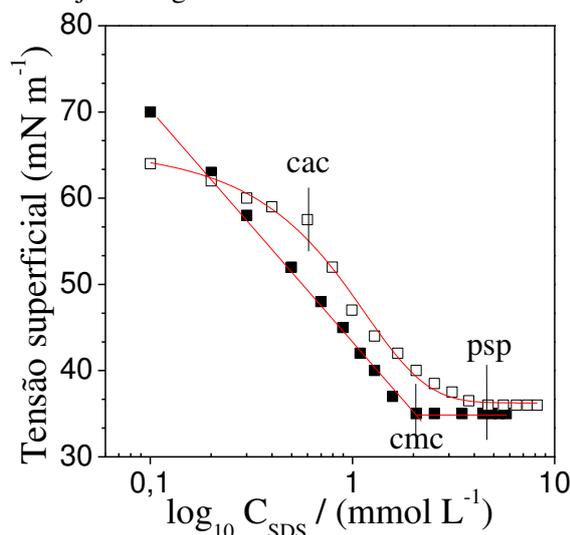
O $R_H^{agg_{real}}$ dos agregados de CHQ foram calculados utilizando a equação de Einstein-Stokes (equação 6). O $R_H^{agg_{real}}$ incrementa de $69,9 \pm 3,2$ nm com uma concentração de $0,05$ mg mL⁻¹ de CHQ até $83,6 \pm 6,5$ nm com $0,4$ mg mL⁻¹ de CHQ em água deionizada, mostrando que a concentração de CHQ afeta o $R_H^{agg_{real}}$, possivelmente porque favorece as interações intermoleculares entre os domínios hidrofóbicos da CHQ e promove a agregação entre os nanoagregados de CHQ. Os $R_H^{agg_{real}}$ obtidos neste trabalho são menores que os reportados por Liu et al., que reportaram a formação de nanocápsulas ocas de CHQ com aproximadamente 200 nm de diâmetro (LIU et al., 2008). Apesar do baixo valor do $R_H^{agg_{real}}$ formado com $0,05$ mg mL⁻¹ de CHQ, este sistema apresenta baixa estabilidade cinética em solução aquosa e após 24 h

acontece a formação de um terceiro modo na distribuição de R_H , com aproximadamente 1000 nm de diâmetro (Figura S4, anexo A). Isto, foi corroborado por TEM (Figura S5, anexo A).

2.3 Interação da carboximetil hexanoil quitosana com dodecil sulfato de sódio.

O SDS pode interagir com a quitosana e quitosana modificada com grupos hidrofóbicos para formar complexos solúveis em solução aquosa. Os complexos de polieletrólitos-SDS podem ser formados em concentrações menores à cmc do surfactante na interface líquido/gás ou no *bulk* da solução. Com o objetivo de formar complexos de CHQ-SDS estáveis em solução aquosa e avaliar se apresentam atividade superficial, foram realizadas medidas de γ . Assim como também, espera-se encontrar a faixa de concentração de SDS (C_{SDS}) na qual acontece a adsorção e interação com $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de CHQ a 298,15 K em tampão fosfato (Figura 31). É importante ressaltar que será avaliada a interação entre os nanoagregados de CHQ com SDS, onde os nanoagregados de CHQ encontram-se em equilíbrio dinâmico com seus unímeros.

Figura 31. Isotherma de adsorção de SDS (escala logarítmica) em (■) tampão pH 7,4 e (□) CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão pH 7,4. As concentrações de agregação são marcadas com linhas verticais e as linhas vermelhas correspondem aos ajustes sigmoide e linear.



Em tampão fosfato, com o incremento da concentração de SDS, a γ diminui abruptamente até a cmc, pela saturação energética da interface (BHARMORIA et al., 2014). Comparando com o sistema SDS – tampão fosfato, observa-se que a γ da solução de CHQ é menor que o tampão fosfato (64 mN m^{-1}), devido ao processo de adsorção dos unímeros e/ou agregados de CHQ na interface líquido/gás da solução de CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Na Figura 31 é

possível observar duas transições, a cac e o psp. Para este sistema, a cac é a concentração de SDS necessária para formar agregados espontaneamente em solução aquosa via interações eletrostáticas, intra e/ou intermoleculares entre o SDS e a CHQ. Por outro lado, a psp é a concentração do surfactante necessária para saturar energeticamente a interface dos agregados de CHQ na dispersão (FERREIRA, 2016; FERREIRA et al., 2015).

Inicialmente, a γ da solução de CHQ 0,05 mg mL⁻¹ diminui com uma taxa menor que no tampão fosfato (inclinação do tampão fosfato > inclinação de solução 0,05 mg mL⁻¹) até a cac (0,6 mmolL⁻¹), indicando que há interação, e que deve acontecer a formação de complexos CHQ-SDS com baixa atividade superficial. Posteriormente, a γ diminui até a psp, pela formação de agregados de CHQ-SDS com alta atividade superficial. Em concentrações acima da psp, a γ permanece constante, porque as interfaces líquido/gás e CHQ/líquido foram energeticamente saturadas e não há mais adsorção de monômeros de SDS, promovendo assim, a agregação dos monômeros de SDS no *bulk* da solução. A cmc do SDS por tensiometria no sistema 0,05 mg mL⁻¹ CHQ foi de 4,60 mmol L⁻¹ (psp), sendo está maior que a cmc de SDS em tampão fosfato (2,10 mmol L⁻¹), comprovando que há interação e formação de agregados entre CHQ-SDS na interface ou no *bulk* do sistema.

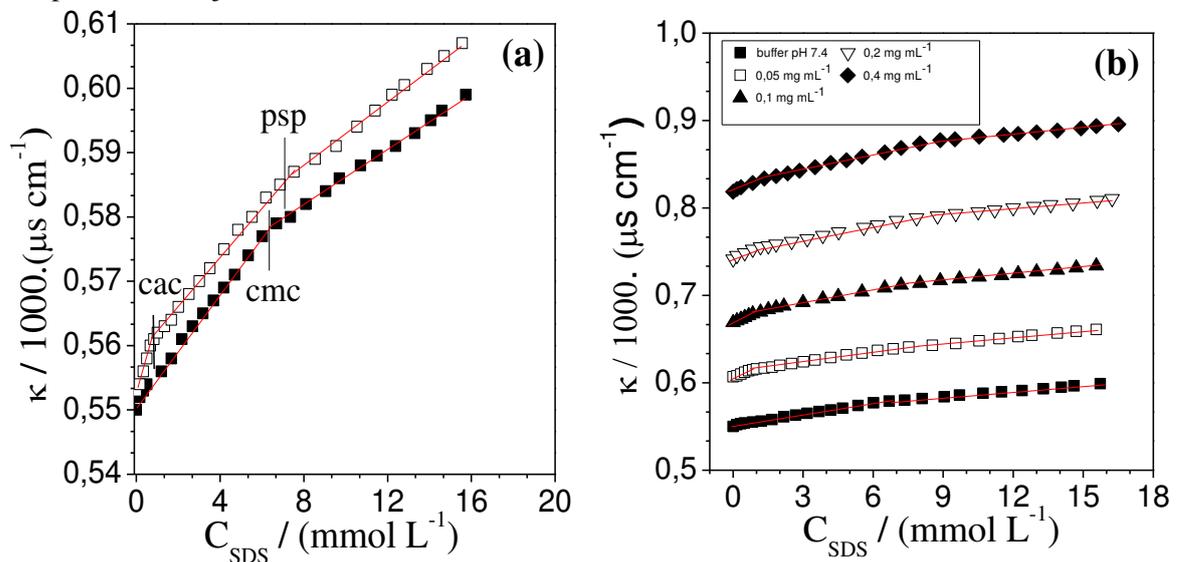
Com o objetivo ter um maior conhecimento sobre o processo de interação e a formação dos agregados de CHQ-SDS no *bulk* da solução, assim como também, calcular o grau de ionização (α) do SDS na micela de SDS e nos complexos de CHQ-SDS, titulações condutimétricas em solução aquosa de SDS em presença e ausência de CHQ (0,05 mg mL⁻¹) foram realizadas a 298,15 K e pH 7,4 (Figura 32a). As diferentes seções da curva foram linearizadas, sendo que os coeficientes de correlação apresentaram valores superiores a 0,998.

Na ausência de CHQ (em tampão fosfato pH 7,4) observaram-se duas regiões, a região pré-micelar e a pós-micelar. A condutividade específica (κ) incrementa rapidamente com o incremento da concentração de SDS até a cmc. Em concentrações superiores da cmc (6,0 mmol L⁻¹) acontece a formação de micelas de SDS no *bulk* da solução. Em comparação com a solução de 0,05 mg mL⁻¹ de CHQ, foram observadas duas concentrações críticas, a cac e o psp. A κ aumenta com o aumento das concentrações dos íons no sistema até a cac (1,08 ± 0,05 mmol L⁻¹).

O processo de interação e de formação dos agregados CHQ-SDS continua até o psp (6,24 ± 0,12 mmol L⁻¹). Em concentrações maiores do psp, não há formação dos complexos

CHQ-SDS. No entanto, os monômeros de SDS agregam-se em solução aquosa para formar micelas, as quais encontra-se em equilíbrio dinâmico com os complexos de CHQ-SDS. Durante os experimentos não foi observada alteração na turbidez da dispersão, indicando que acontece a formação de complexos solúveis CHQ-SDS em tampão pH 7,4. Porém, quando a interação acontece em tampão pH 4, o sistema torna-se turvo pela formação de complexos insolúveis de CHQ-SDS. Isto, deve-se à forte interação eletrostática entre os grupos amina da CHQ, carregados positivamente (NH_3^+), e os grupos sulfato do SDS carregados negativamente. Os valores da cac e psp obtidos por condutividade com $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de CHQ em tampão fosfato pH 7,4 são inferiores aos obtidos por tensiometria. Assim, estes parâmetros são fortemente dependentes da técnica utilizada para obtê-los (DE MODOLON et al., 2009). Além disso, o baixo valor da γ em presença do polímero, mesmo antes de atingir a cac, sugere que a interação CHQ-SDS e a formação dos pré-agregados, ocorrem abaixo da cac (obtido com as duas técnicas)(MINATTI; NORWOOD; REED, 1998; NORWOOD; MINATTI; REED, 1998).

Figura 32. Curvas de condutividade (escala relativa) em solução aquosa de SDS em (a) tampão pH 7,4 (■) CHQ $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (□). (b) diferentes concentrações (0 - $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) de CHQ em tampão pH 7,4 a 298,15 K. As transições de agregação são marcadas com linhas verticais e as linhas vermelhas correspondem aos ajustes lineares.



Para avaliar o efeito da concentração de CHQ sobre os parâmetros de agregação na interação de CHQ-SDS, curvas de titulação condutimétricas de SDS em diferentes concentrações de CHQ ($0,05 - 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) a 298,15 K e tampão fosfato pH 7,4 foram realizadas (Figura 32b). A cmc, cac, o grau de ionização do surfactante na micela de SDS (α_2), o grau de ionização do surfactante no complexo CHQ-SDS (α_1), a variação da energia livre Gibbs padrão da associação CHQ-SDS (ΔG_{cac}^0), a variação da energia livre Gibbs padrão da

formação de micelas de SDS em presença de CHQ ($\Delta G_{\text{psp}}^{\circ}$) e a variação da energia livre Gibbs padrão da adsorção das micelas de SDS na macromolécula de CHQ ($\Delta \Delta G_{\text{agg}}^{\circ}$) a 298,15 K foram calculados (tabela 1). As equações utilizadas para calcular os parâmetros de agregação estão reportadas no anexo C.

Os valores da cac permanecem quase constantes e a psp incrementa, com o incremento da concentração de CHQ, pois a necessidade de uma maior quantidade de monômeros de surfactante para saturar a interface do polímero. Este comportamento foi reportado por Samuel de Medeiros Modolon *et al.* na interação entre SDS e etil(hidroxietil) celulose (EHCE) (DE MODOLON *et al.*, 2009). Os valores de α_1 e α_2 foram obtidos da razão das inclinações das curvas de condutividade acima e abaixo da psp e a cmc, respectivamente. Os valores de α_1 são menores que os valores de α_2 , indicando que os complexos de CHQ-SDS são menos ionizáveis que nas micelas regulares de SDS. Utilizando os valores de α_1 e α_2 foram calculados a $\Delta G_{\text{cac}}^{\circ}$ e $\Delta G_{\text{psp}}^{\circ}$ para todas as concentrações de CHQ avaliadas. Estes parâmetros termodinâmicos de agregação determinam a viabilidade na formação dos complexos de CHQ-SDS e das micelas de SDS em presença de CHQ, respectivamente.

Os valores de $\Delta G_{\text{cac}}^{\circ}$ e $\Delta G_{\text{psp}}^{\circ}$ são negativos e variam pouco com o incremento da concentração de CHQ, mostrando que os complexos de CHQ-SDS e as micelas de SDS formam-se espontaneamente em tampão fosfato pH 7,4. Os valores de $\Delta \Delta G_{\text{agg}}^{\circ}$ foram calculados assumindo que os agregados de SDS na cmc e o SDS adsorvido nos agregados de CHQ apresentam forças similares de interação. Este parâmetro termodinâmico determina a favorabilidade do processo de formação dos agregados de CHQ-SDS em comparação à micelas de SDS. O modulo dos valores de $\Delta \Delta G_{\text{agg}}^{\circ}$ diminui de $-6,84 \pm 0,45$ até $-4,01 \pm 0,11$ kJ mol⁻¹ com o incremento da concentração de CHQ, indicando que o incremento da concentração de CHQ, diminui a espontaneidade da interação CHQ-SDS e as interações polímero-polímero podem-se tornar importantes.

A força motriz que dirige a formação dos complexos CHQ-SDS é provavelmente o efeito hidrofóbico (interação entre as cadeias hidrocarbônicas dodecil do SDS e CHQ), uma vez que há repulsão eletrostática, entre os grupos carboximetil da CHQ e os grupos sulfato de SDS (carregados negativamente em pH 7,4). As unidades GlcNAc (2-acetoamido-2-deoxi- β -1,4-D-glicopirronase) na CHQ, são domínios hidrofóbicos que favorecem a inclusão de grupos hidrofóbicos e, portanto, o processo de agregação (KORCHAGINA; PHILIPPOVA, 2010,

2015). Com o objetivo de investigar se as interações hidrofóbicas promovem a agregação CHQ-SDS e determinar os valores de energia associados a este processo, medidas de espectroscopia de emissão de fluorescência e ITC foram realizadas.

O pireno foi utilizado como sonda para monitorar o processo de agregação. A emissão de fluorescência do pireno tem sido amplamente utilizada para estudar interações polímero-surfactante, uma vez que oferece uma forma rápida, simples e altamente sensível na determinação de interações hidrofóbicas (FERREIRA et al., 2015). A Figura 33a mostra a variação da razão das bandas do pireno I_1/I_3 versus $\log_{10}(C_{SDS})$ em presença e ausência de CHQ.

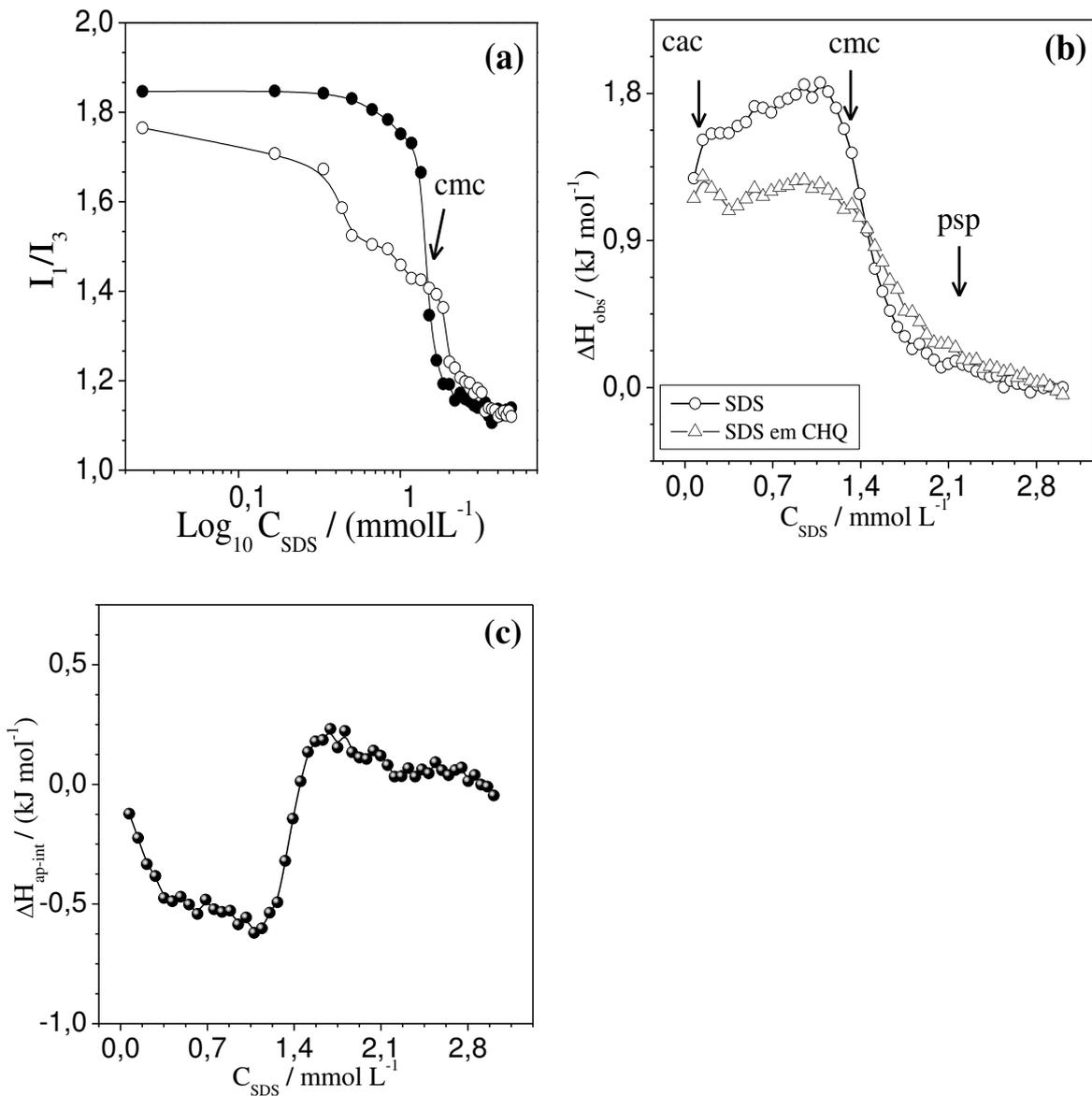
Inicialmente, a razão das bandas do pireno I_1/I_3 em presença de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de CHQ inicia num valor menor ($\approx 1,79$) do que no buffer de fosfato ($\approx 1,84$). *i.e.*, a sonda encontra-se num meio mais hidrofóbico quando está em presença de CHQ, pela interação com grupos e domínios hidrofóbicos da CHQ. Para as duas curvas a razão I_1/I_3 diminui, com o aumento da C_{SDS} até aproximadamente $\approx 1,12$. No entanto, para o sistema com CHQ a razão das bandas I_1/I_3 diminui desde $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDS. Estes resultados concluem: (1) As interações hidrofóbicas dirigem a formação do complexo CHQ-SDS e (2) Suporta a hipótese que a interação entre CHQ-SDS inicia em concentrações menores da cac.

ITC determina a quantidade de calor liberado ou absorvido nos processos de interações moleculares, a temperatura e pressão constante. O ITC tem sido amplamente aplicado na determinação de parâmetros termodinâmicos (Variação da entalpia de interação (ΔH), variação da entropia de interação (ΔS), variação da energia livre de Gibbs de interação (ΔG)) na interação entre SDS com polímeros (KABIRI; UNSWORTH, 2014). A Figura 33b apresenta as variações da entalpia molar observada (ΔH_{obs}) na diluição de SDS 19 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,4 e $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ CHQ a $298,15 \text{ K}$.

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos e de agregação da interação CHQ-SDS em tampão pH 7,4 a $298,15 \text{ K}$.

CHQ mg mL^{-1}	cac mmol L^{-1}	psp mmol L^{-1}	α_1	α_2	ΔG_{cac}^o kJ mol^{-1}	ΔG_{psp}^o kJ mol^{-1}	$\Delta \Delta G_{agg}^o$ kJ mol^{-1}
0,05	$1,08 \pm 0,05$	$6,24 \pm 0,12$	$0,40 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,03$	$-27,43 \pm 1,37$	$-17,23 \pm 0,89$	$-6,84 \pm 0,45$
0,1	$1,17 \pm 0,04$	$7,27 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,05$	$-25,71 \pm 1,28$	$-18,02 \pm 0,70$	$-5,12 \pm 0,25$
0,2	$1,15 \pm 0,03$	$7,86 \pm 0,09$	$0,49 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,02$	$-25,46 \pm 1,27$	$-17,99 \pm 0,85$	$-4,95 \pm 0,21$
0,4	$1,20 \pm 0,90$	$8,83 \pm 0,17$	$0,52 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,09$	$-24,60 \pm 1,29$	$-18,38 \pm 0,92$	$-4,01 \pm 0,11$

Figura 33. (a) Razão I_1/I_3 das bandas de emissão de fluorescência do pireno versus o Log_{10} da concentração de SDS em tampão pH 7,4 (●) e CHQ 0,05 mg mL^{-1} (○); (b) Curvas de titulação calorimétrica da adição de 19 mmol L^{-1} de SDS em tampão fosfato pH 7,4 (○) e CHQ 0,05 mg mL^{-1} (Δ) a 298,15 K; (c) Variação da entalpia molar aparente em função da concentração de SDS. A $\Delta H_{\text{ap-int}}$ foi obtida da subtração da curva de diluição de SDS da curva de titulação de SDS na solução de CHQ. As linhas servem apenas como guia visual.



A variação da potência (W) em função do tempo para ambos sistemas pode-se observar na Figura S6, no anexo A. A curva sigmoide típica da diluição de SDS mostra uma pequena mudança da entalpia associada ao processo de micelização (FERREIRA et al., 2015; ONESIPPE; LAGERGE, 2008a). A diluição de SDS em tampão fosfato é totalmente

endotérmico antes do processo de micelização do SDS ($\text{cmc} = 1,33 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$, valor calculado pelo método da primeira derivativa), e muda para exotérmico no processo pós-micelização. Esse comportamento está de acordo com dados previamente relatados na literatura (FERREIRA et al., 2015; KABIRI; UNSWORTH, 2014).

A diluição de SDS em $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ de CHQ apresenta um comportamento similar aos valores de ΔH_{obs} , porém diferentes na faixa de 0 a $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDS, demonstrando que a interação CHQ-SDS ocorre no nível molecular. Os valores de cac ($0,14 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$) e o psp ($2,21 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$) também foram obtidos a partir das medidas de ITC. Para determinar as alterações de entalpia causadas apenas pela agregação CHQ-SDS, o termograma da diluição de SDS em tampão fosfato pH 7,4 foi subtraído da diluição de SDS em $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ CHQ, e assim obter a variação da entalpia molar aparente de interação (ΔH_{ap-int}) (Figura 33c). Na região pré-micelar, a interação CHQ-SDS é totalmente exotérmica até a concentração de SDS $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ (valor superior ao cac). O pequeno valor de ΔH_{ap-int} sugere que o processo acontece por interações hidrofóbicas cooperativas entre as cadeias hidrocarbônicas do dodecil sulfato e os domínios hidrofóbicos nos agregados de CHQ. O ΔH_{ap-int} incrementa endotermicamente com a C_{SDS} até $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$. A mudança de valores exotérmicos para endotérmicos da ΔH_{ap-int} está associada principalmente as contribuições entálpicas de duas interações moleculares; i) entre os monômeros de SDS com agregados de CHQ e, ii) entre os monômeros de SDS adsorvidos na interface da CHQ. Como a C_{SDS} aumenta, o número de sítios hidrofóbicos disponíveis diminui, diminuindo a contribuição exotérmica da interação CHQ-SDS. Além disso, na interface da CHQ, a repulsão eletrostática entre os grupos sulfato do SDS aumenta, aumentando a contribuição endotérmica. Na concentração de SDS igual a $1,60 \text{ mmol L}^{-1}$, os valores da ΔH_{ap-int} são endotérmicos, indicando que a contribuição entálpica proveniente da interação monômero-monômero de SDS na interface da CHQ, predomina sobre a contribuição da interação CHQ-SDS. Na psp $1,82 \text{ mmol L}^{-1}$, os valores de ΔH_{ap-int} diminuem gradualmente de $0,21 \text{ kJ mol}^{-1}$ até zero, indicando a saturação dos agregados de CHQ pelos monômeros de SDS, e acontece a formação de micelas de SDS no sistema (ONESIPPE; LAGERGE, 2008a, 2008b; THONGNGAM; MCCLEMENTS, 2005). Os valores de ΔG_{cac} , ΔG_{psp} e $\Delta \Delta G_{agg}$ obtidos pelo ITC foram $-35,19 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-20,76 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $-8,43 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente (calculados usando as equações A.3-A.6, no anexo C). Estes parâmetros termodinâmicos são negativos, indicando que a interação CHQ-SDS é um processo espontâneo. Embora os valores da cac e psp encontrados por ITC e condutividade sejam ligeiramente diferentes, os valores de $\Delta \Delta G_{agg}$ obtidos pelas duas técnicas são similares.

Para avaliar as contribuições entálpicas na interação CHQ-SDS, a variação da entalpia integral na formação dos agregados de CHQ-SDS (ΔH_{agg}) foi calculada utilizando o método proposto por Olofsson e Loh (equação A7, anexo C), que expressa a variação da entalpia necessária para que ocorra a formação de um mol de agregados de CHQ-SDS, pela interação de mol de monômeros de SDS, no intervalo de concentração cac -psp (OLOFSSON; LOH, 2009). O valor da ΔH_{agg} para 0,05 mg mL⁻¹ de CHQ-SDS é -2.11 kJ mol⁻¹, demonstrando que a agregação de SDS na interface da CHQ é um processo exotérmico. O mesmo resultado foi reportado na interação entre o SDS e a dodecil-quitosana (ONESIPPE; LAGERGE, 2008b).

2.4 Raio hidrodinâmico e estabilidade dos agregados de SDS-CHQ em solução aquosa.

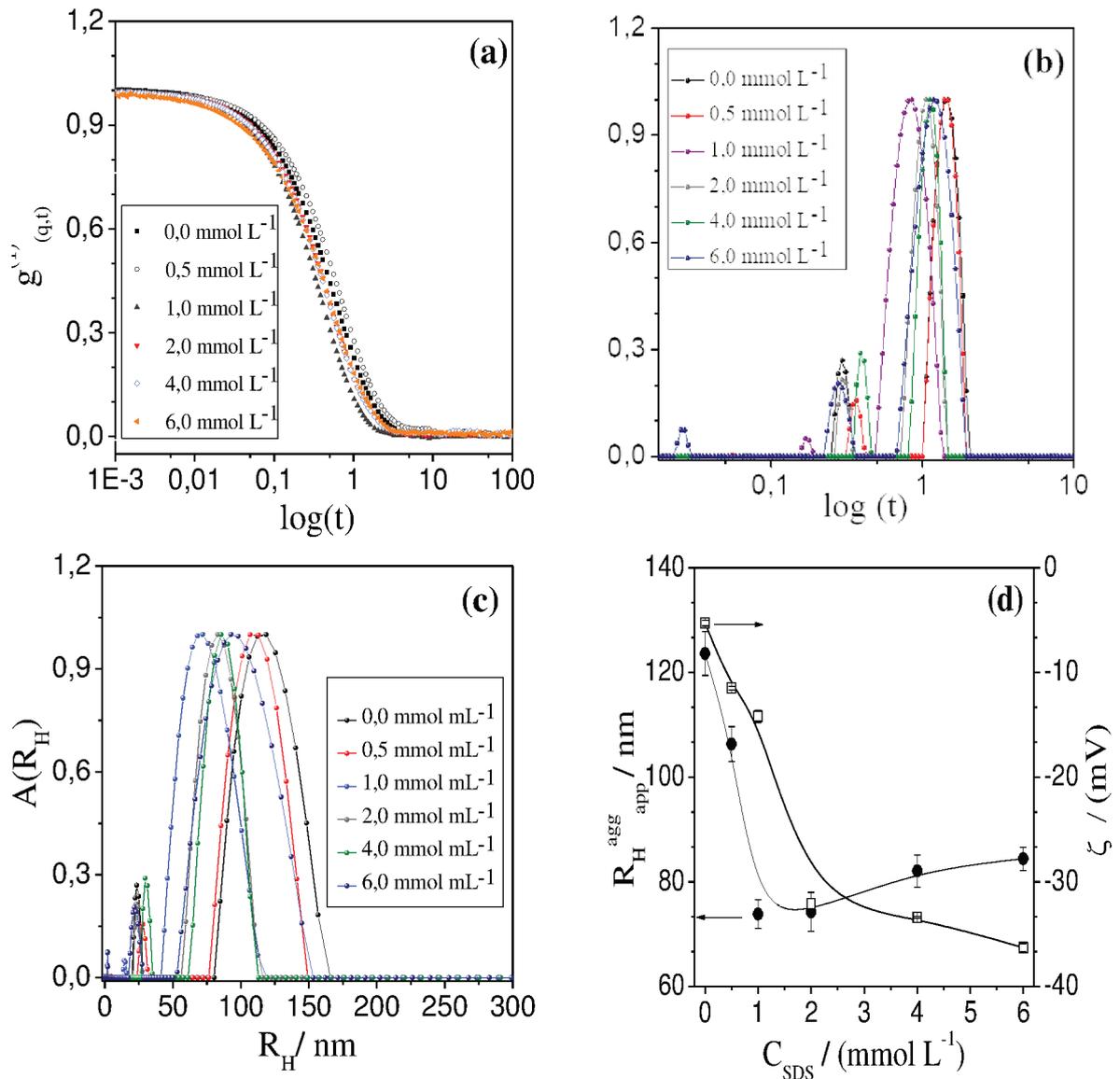
A Figura 34a. mostra o efeito da C_{SDS} sobre funções de autocorrelação de DLS e as respectivas distribuições de tamanho dos complexos CHQ-SDS em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento de 90° e 298,15 K. O tempo de relaxação das curvas de autocorrelação desloca-se para valores menores com o incremento da C_{SDS} , isto é, os agregados CHQ-SDS são menores que os agregados de CHQ em ausência de SDS. Estes resultados são facilmente vistos a partir da distribuição do tempo de decaimento no ângulo de espalhamento de 90° (Figura 34b).

Os complexos de CHQ-SDS apresentam uma distribuição de tamanho bimodal, como observado com os agregados de CHQ. No entanto, em altas C_{SDS} (6,0 mmol L⁻¹), é possível visualizar um terceiro modo em torno de $\tau = 0,025$ s, sugerindo a formação de agregados de menor tamanho. O respectivo valor de R_H é de 2,10 nm (Figura 34c) (FERREIRA et al., 2015), sugerindo a formação de micelas livres de SDS. Este resultado se encontra em estreita concordância com os resultados obtidos com outras técnicas.

A dependência angular (entre 30° e 140°) foi utilizada para obter $R_H^{agg}_{real}$ usando a equação de Einstein-Stokes (Figura S7, anexo C), para o modo lento da distribuição de tamanho (Figura 34d). Assim como também, foi avaliado o efeito da C_{SDS} no valor do potencial zeta dos complexos CHQ-SDS (Figura 34d).

O $R_H^{agg}_{real}$ diminui de $123,6 \pm 4,2$ nm para $73,8 \pm 2,6$ nm, com o incremento da C_{SDS} até 1,0 mmol L⁻¹ (aproximadamente o valor da cac obtida por condutividade). Sugerindo que a adsorção dos monômeros de SDS na interface da CHQ leva a um menor tamanho do agregado.

Figura 34. Efeito da concentração de SDS sobre; (a) Função de autocorrelação de DLS $g^{(1)}(q,t)$, (b) Função de distribuição de tempo de decaimento $A(\tau)$, (c) Função de distribuição de tamanho $A(R_H)$ dos agregados de SDS-CHQ em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K. d) raio hidrodinâmico real (\bullet) e potencial Zeta ζ (\square) dos agregados de SDS-CHQ. As linhas sólidas servem apenas como guia visual.

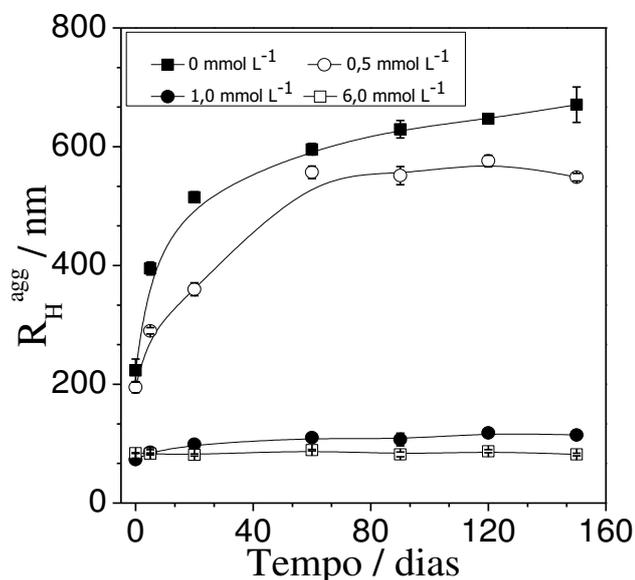


Por outro lado, o potencial zeta diminui de $-5,28 \pm 0,28$ mV para $-32,10 \pm 0,50$ mV com o incremento da C_{SDS} até $2,0$ mmol L⁻¹. Assim, provavelmente os grupos sulfato do SDS permanecem em contato com a fase aquosa, incrementando a repulsão eletrostática entre os agregados. Com o incremento da C_{SDS} de $2,0$ até $6,0$ mmol L⁻¹ o $R_H^{\text{agg}}_{\text{real}}$ incrementou ligeiramente até $84,3 \pm 2,2$ nm ($6,0$ mmol L⁻¹ de SDS). O excesso de surfactante e o incremento da força iônica pode diminuir a repulsão eletrostática entre grupos negativos (COO^- e SO_4^-) na interface do agregado, permitindo atingir um maior tamanho. Além disso, o potencial zeta

diminui até $-36,3 \pm 0,4$ mV com $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDS, já que a repulsão eletrostática da interface (negativa) diminui a adsorção dos monômeros SDS, promovendo a formação de micelas de SDS.

Para determinar a estabilidade cinética dos agregados de CHQ-SDS formados com diferentes concentrações de SDS, foi monitorado a evolução da R_H^{agg} (modo lento) no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ a $278,15 \text{ K}$ no tampão pH 7,4 durante 5 meses por DLS (Figura 35). Verificou-se que sem SDS e com $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDS o R_H^{agg} aumentou rapidamente ao longo do tempo até $670 \pm 30 \text{ nm}$ e $548 \pm 6 \text{ nm}$, respectivamente. É importante destacar que após 120 dias foi observada precipitação dos sistemas mencionados, no entanto foi reportado o R_H^{agg} dos agregados presentes na fase aquosa. Por outro lado, o tamanho dos agregados com mais surfactante permaneceu constante e nenhum processo de floculação foi observado no período de estudo.

Figura 35. Efeito do tempo no raio hidrodinâmico aparente R_H^{agg} das CHQ-SDS em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ a $298,15 \text{ K}$ com diferentes concentrações de SDS ($0 - 6 \text{ mmol L}^{-1}$). As linhas servem apenas como guia visual.



CAPÍTULO III

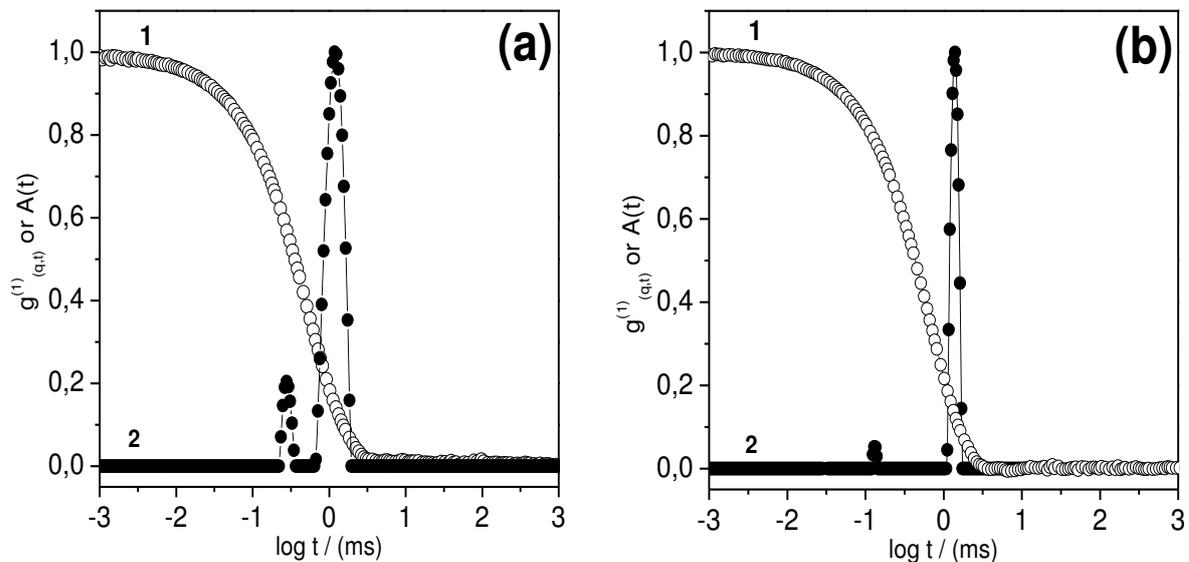
3 NANOPARTÍCULAS DE CARBOXIMETIL-HEXANOIL QUITOSANA/ DODECIL SULFATO DE SÓDIO: EFICIENTE NANOCARREADOR DA PIRAZOLINA H3TM04 COM ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA.

Neste capítulo está descrito o desenvolvimento de Nps de CHQ-SDS e caracterização por DLS, potencial zeta e TEM. As Nps foram aplicadas na encapsulação da pirazolina modelo H3TM04 com atividade antileucêmica, avaliando o comportamento e a cinética de liberação *in vitro*. Além disso, foram realizados ensaios de citotoxicidade das Nps em ausência e presença da pirazolina sob células de leucemia mieloide crônica (K562) e linfoblástica aguda (Jurkat). Além disso, o efeito citotóxico do composto H3TM04 foi verificado observando mudanças morfológicas das células tratadas utilizando microscopia de fluorescência.

3.1 Caracterização das nanopartículas

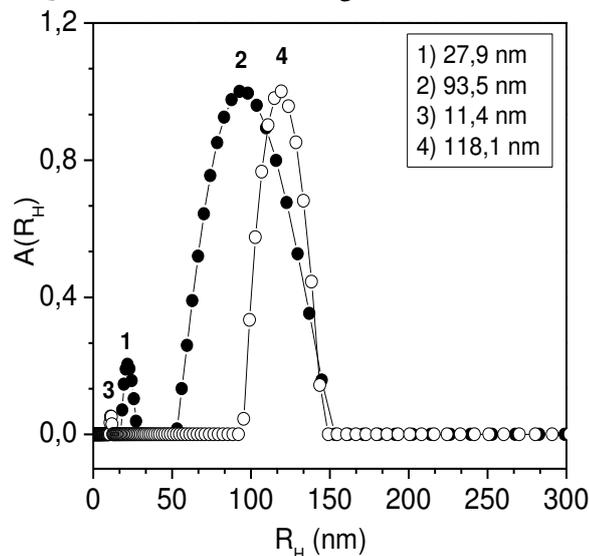
O tamanho das Nps desempenha um papel fundamental no tempo de circulação, na disposição e distribuição nos tecidos biológicos, como também no mecanismo de endocitose (MU et al., 2016). Assim, o tamanho médio das Nps de CHQ-SDS e CHQ-SDS-H foram determinados por DLS. As Figuras 36a e 36b apresentam a $g^{(1)}(q, t)$ e a $A(t)$ obtido pelo método CONTIN a 90° e 298,15 K. Para ambas amostras, pode-se observar uma distribuição bimodal, onde o modo lento apresenta menor amplitude no sistema CHQ-SDS-H que nas Nps de CHQ-SDS. Este resultado sugere que o H3TM04 promove interações hidrofóbicas com os componentes do sistema e diminui a distribuição de τ das Nps de CHQ-SDS-H em solução aquosa.

Figura 36. (1) Função de autocorrelação $g^{(1)}(q, t)$ e (2) função de distribuição de tempo de decaimento $A(t)$ obtida pelo método CONTIN no ângulo de espalhamento de 90° a 298,15 K para (a) CHQ-SDS e (b) CHQ-SDS-H em tampão fosfato pH 7,4. Nas duas amostras, o modo lento representa o 98% da população.



As distribuições de τ apresentadas não diferem da $A(R_H)$ obtida, a 90° e 298,15 K (Figuras 36a e 36b). As Nps de CHQ-SDS e CHQ-SDS-H apresentaram uma distribuição bimodal, indicando duas populações em cada amostra. Para analisar a variação do raio hidrodinâmico das nanopartículas (R_H^{Np}), determinou-se a $A(R_H)$ para CHQ-SDS e CHQ-SDS-H em tampão fosfato pH 7,4 no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ a 298,15 K (Figura 37).

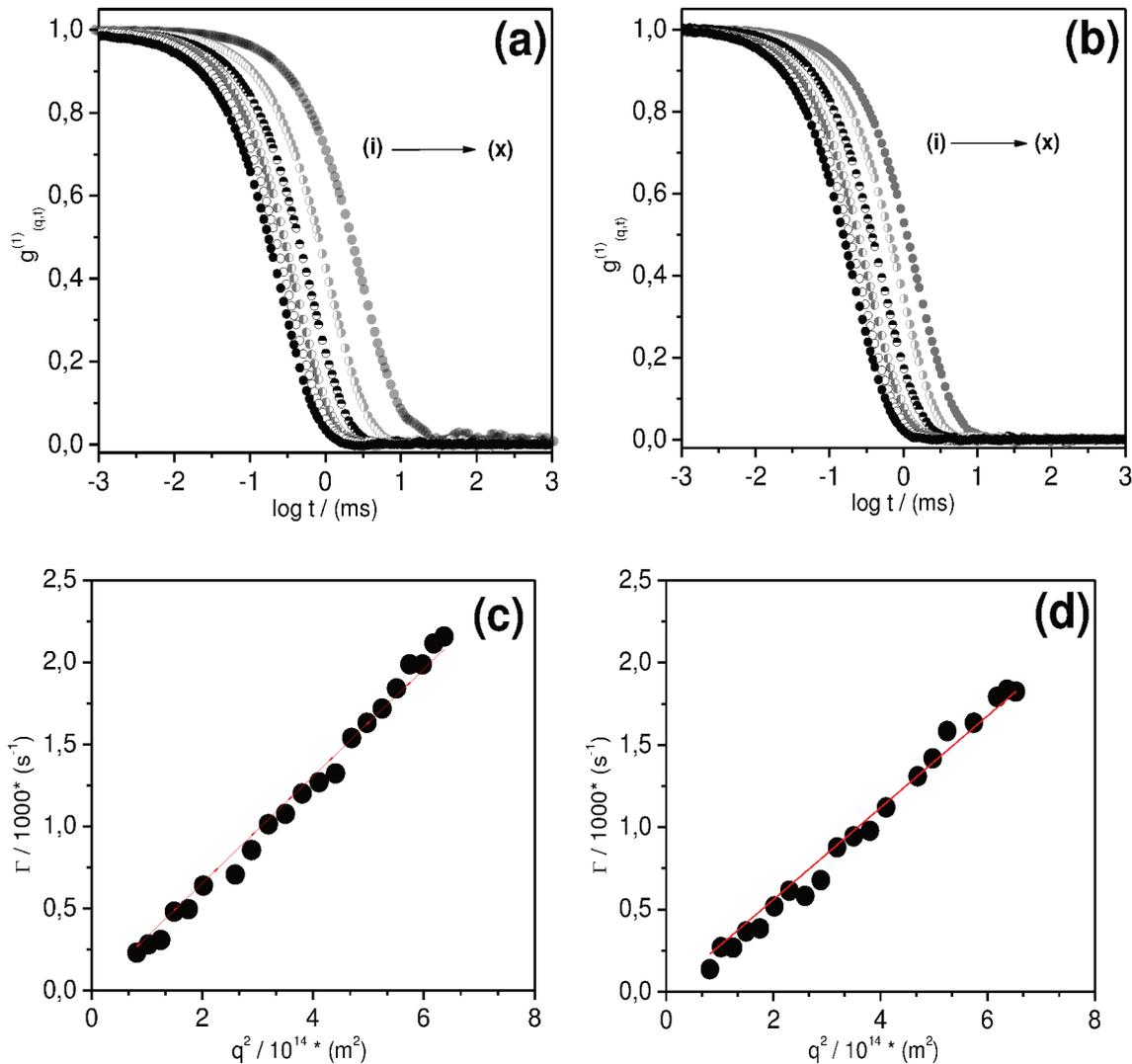
Figura 37. Função de distribuição de tamanho $A(R_H)$ no ângulo de espalhamento de 90° a 298,15 K para (●) CHQ-SDS e (○) CHQ-SDS-H. No interior do gráfico mostra-se os R_H de cada distribuição.



O R_H^{Np} da distribuição lenta para as Nps de CHQ-SDS-H (118,1 nm) a 90° é maior do que as Nps de CHQ-SDS (93,5 nm), demonstrando que o encapsulamento da pirazolina aumenta o tamanho médio das Nps. Estes resultados evidenciam o encapsulamento do H3TM04 no interior e/ou nos sítios hidrofóbicos da superfície interna das Nps. Para determinar o raio hidrodinâmico real das Nps ($R_H^{Np_{real}}$), medidas de DLS em diferentes ângulos de espalhamento (30° e 140°) para ambas as amostras foram realizadas (Figuras 38a e 38b). Isto, permite analisar o comportamento da Γ ($\Gamma = \tau^{-1}$) para as distribuições lentas em função do quadrado do vetor de espalhamento q^2 . (Figuras 38c e 38d).

Os gráficos de Γ vs q^2 passam pela origem, indicando que o tempo de decaimento das Nps acontece por difusão translacional (KORCHAGINA; PHILIPPOVA, 2015). Os coeficientes de difusão real das Np ($D^{Np_{real}}$) foram calculados a partir da inclinação do gráfico Γ vs q^2 , obtendo $3.27 \times 10^{-12} \text{ m s}^{-2}$ e $2.79 \times 10^{-12} \text{ m s}^{-2}$ para CHQ-SDS e CHQ-SDS-H, respectivamente. Utilizando os respectivos valores de $D^{Np_{real}}$, pode-se calcular o $R_H^{Np_{real}}$ utilizando a equação de Einstein-Stokes (equação 6). O $R_H^{Np_{real}}$ das Nps de CHQ-SDS-H ($83,9 \pm 1,2 \text{ nm}$) é maior que das Nps CHQ-SDS ($71,8 \pm 0,6 \text{ nm}$). Não foi possível determinar o $R_H^{Np_{real}}$ para a distribuição rápida, porque esta população não se evidenciou em todos os ângulos de espalhamentos avaliados.

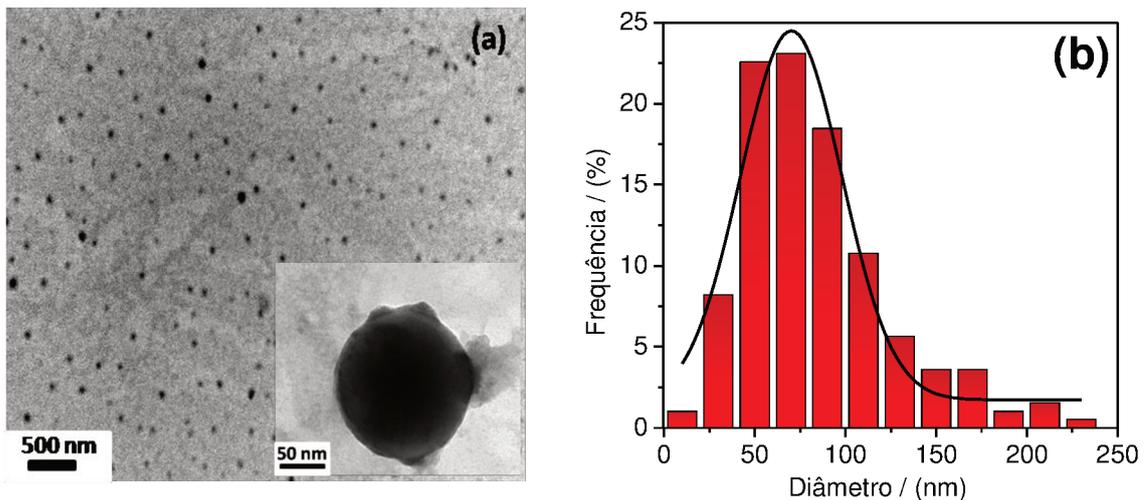
Figura 38. Função de autocorrelação $g^{(1)}(q,t)$ e dependência da taxa de relaxação em função do vetor de espalhamento q^2 para (a,c) CHQ-SDS e (b,d) CHQ-SDS-H para diferentes ângulos de espalhamento (variando de 30° até 140°) em tampão fosfato pH 7,4 e 298,15 K. Nas figuras a e b, de (i) para (x) corresponde aos ângulos de espalhamento 140° , 120° , 100° , 80° , 60° e 40° .



A morfologia das Nps foi avaliada por TEM. A Figura 39a mostra que as Nps de CHQ-SDS possuem morfologia esférica com diâmetro médio de $70,1 \pm 2,3 \text{ nm}$ (Figura 39b). O raio médio das nanopartículas obtidas por TEM ($\approx 35 \text{ nm}$) é menor que o $R_{H}^{\text{Np}}_{\text{real}}$ obtido por DLS ($71,8 \text{ nm}$). Este resultado era esperado, pois, na técnica de DLS foi avaliado o tamanho das nanopartículas intumescidas com solvente, já na microscopia foi determinado o tamanho da Nps secas.

Para determinar a carga média na superfície do particulado foram realizadas medidas de potencial Zeta. Este potencial eletrocinético reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica das Nps e a camada difusa ao redor do plano de cisalhamento (DEVADASU; BHARDWAJ; KUMAR, 2013). Na ausência de H3TM04, as Nps apresentam um potencial zeta negativo de $-30,8 \pm 0,1$ mV, devido à presença de grupos carboxilato da CHQ e sulfato do SDS na superfície. Por outro lado, o potencial zeta das Nps de CHQ-SDS-H foi de $-29,6 \pm 0,7$ mV, sugerindo que a pirazolina não afeta a carga superficial das Nps. Portanto, o H3TM04 deve estar em maior proporção no interior da partículas e não se encontra exposto à fase aquosa.

Figura 39. (a) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas CHQ-SDS, utilizando como contraste acetato de urânio. O *inset* em (a) mostra uma nanopartícula com morfologia esférica. (b) Distribuição de tamanho de CHQ-SDS com diâmetro meio de $70,1 \pm 2,3$ nm

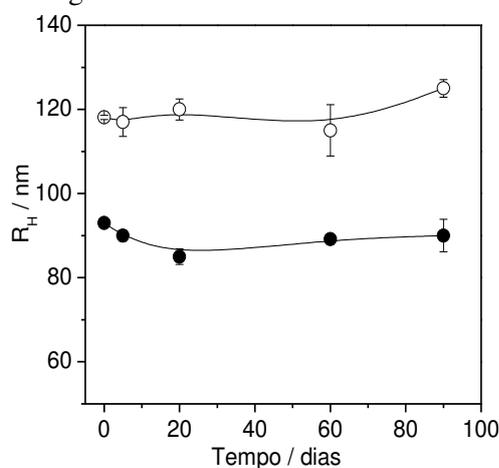


Considerando que a estabilização das Nps ocorre apenas por estabilização eletrostática, os valores do potencial zeta estão dentro da faixa de boa estabilidade para sistemas coloidais, pois nanomateriais com valores de potencial zeta entre -30 mV e 30 mV apresentam boa estabilidade em solução aquosa, mantendo os sistemas dispersos e estáveis por longos períodos de armazenamento (DEVADASU; BHARDWAJ; KUMAR, 2013). Estes resultados do potencial zeta encontram-se em concordância com os valores (-42 a -23 mV) reportados por Liu et al., para Nps de CHQ com diferentes graus de substituição dos grupos hexanoil e carboximetil (LIU et al., 2008). Além da boa estabilidade, Nps com superfície negativa apresentam maior tempo de circulação e distância percorrida dentro de tumores em comparação com Nps com superfície positiva, permitindo aumentar a probabilidade de atingir o tecido

tumoral interno (DEVADASU; BHARDWAJ; KUMAR, 2013; KORCHAGINA; PHILIPPOVA, 2015).

A estabilidade cinética das dispersões de CHQ-SDS e CHQ-SDS-H foi avaliada seguindo a evolução da distribuição de tamanho durante o tempo de armazenamento. Verificou-se que para ambas as amostras não houve mudança significativa na distribuição de tamanho ao longo de 90 dias (Figura 40).

Figura 40. Efeito do tempo de armazenamento sobre o raio hidrodinâmico das nanopartículas de (●) CHQ-SDS e (○) CHQ-SDS-H em tampão pH 7,4 no ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K. As linhas sólidas servem apenas como guia visual.

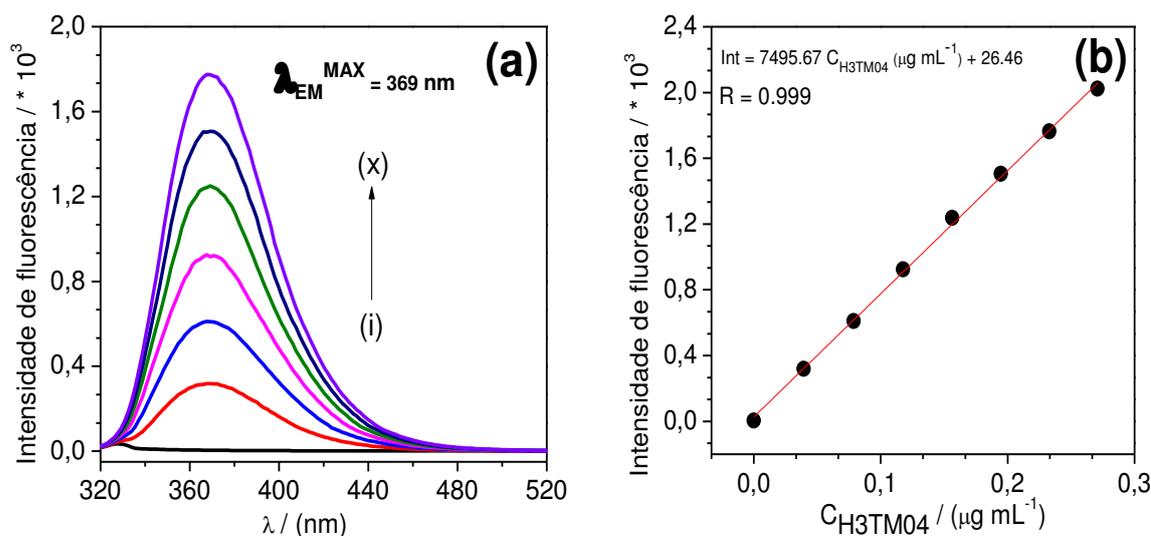


3.2 Eficiência de encapsulação (% EE_{Nps})

A eficiência de encapsulação do H3TM04 nas Nps foi determinada por espectroscopia de emissão fluorescência usando uma curva de calibração de padrão externo (Figura 41). A % EE_{Nps} usando 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H3TM04 foi de $96,8 \pm 0,1\%$, indicando que as Nps de CHQ-SDS podem fornecer alta eficiência no encapsulamento de compostos hidrofóbicos, como a pirazolina testada. Liu e et al. encapsularam DOX em Nps de CHQ, reportando que, aumentando a porcentagem de grupos hexanoil no polímero de 0 a 48%, a porcentagem de encapsulação aumenta de 26,3 para 46,8% (LIU et al., 2008). Portanto, o valor da % EE_{Nps} obtido neste estudo, pode ser atribuído ao ambiente hidrofóbico microheterogêneo formado pela interação entre os grupos hexanoil no esqueleto da CHQ e as cadeias dodecil do SDS (ONESIPPE; LAGERGE, 2008b, 2008a; RENGIFO et al., 2019). Para confirmar esta hipótese, experimentos para determinar o microambiente do H3TM04 nas Nps foram realizados.

Para determinar a polaridade do ambiente microheterogêneo ao qual o H3TM04 é exposto dentro das Nps, foram obtidos espectros de emissão de fluorescência do H3TM04 nos agregados de CHQ (aq) e nas Nps CHQ-SDS (CHQ-SDS-H).

Figura 41. (a) Espectros de emissão de fluorescência do H3TM04 em acetonitrila (os espectros de (i) para (x) correspondem a 0,04 para 0,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H3TM04). (b) Curva de calibração de H3TM04 em acetonitrila. A linha vermelha corresponde ao ajuste linear.

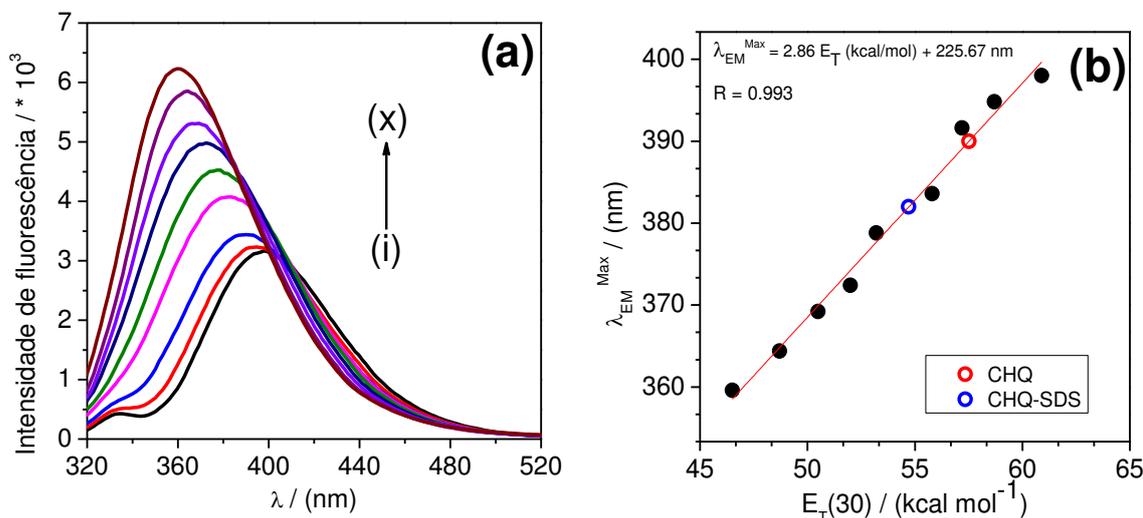


3.1 Localização do H3TM04 nas nanopartículas.

Este método permite identificar a localização do sítio de ligação do fármaco dentro dos nanoagregados, com base no perfil do espectro de emissão de fluorescência de misturas água/dioxano com polaridade conhecida (GHOSH et al., 2014; MONDAL; GHOSH; MUKHERJEE, 2016; PAUL; GUCHHAIT, 2011). A Figura 42a apresenta os espectros de emissão de fluorescência do H3TM04 em várias misturas água/dioxano, com proporções entre 10 e 90% de dioxano.

A emissão de fluorescência aumenta com o aumento da concentração de dioxano na mistura, com deslocamento do comprimento de onda máximo para o azul (λ_{EM}^{Max}), devido à diminuição da polaridade do ambiente microheterogêneo do H3TM04. O λ_{EM}^{Max} , foi correlacionado com o parâmetro de polaridade equivalente às misturas de água / dioxano $E_T(30)$ (Figura 42b), previamente reportados por Kosower et al. (GHOSH et al., 2014).

Figura 42. (a) Espectros de emissão de fluorescência de H3TM04 em diferentes proporções água-dioxano (os espectros de (i) para (x) correspondem à porcentagem de dioxano (v/v) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90). (b) Comprimento de onda máximo da emissão de fluorescência do H3TM04 versus a energia de transição $E_T(30)$ do H3TM04 em diferentes proporções de água-dioxano (10 a 90% de dioxano). A linha vermelha corresponde ao ajuste linear.



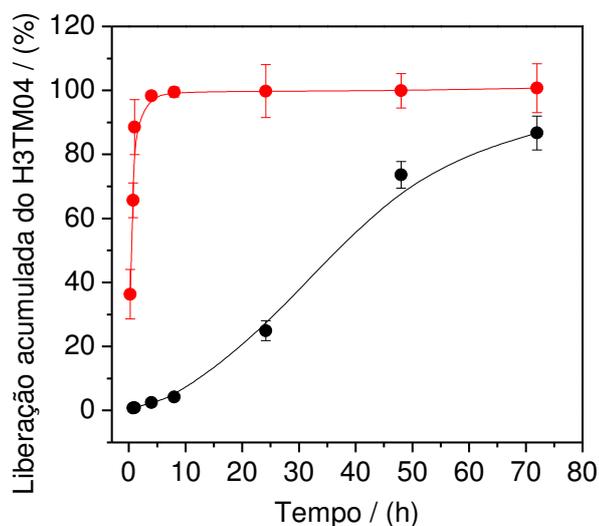
Assumindo que este comportamento possa ser aplicado aos nanoagregados, por interpolação do λ_{EM}^{Max} , é possível determinar o valor de $E_T(30)$ do H3TM04 dentro dos nanoagregados de CHQ e das Nps de CHQ-SDS. O valor $E_T(30)$ para um solvente é definido como a energia de transição para a banda de absorção de maior comprimento de onda do corante betain (2) piridinium-N-fenóxido em kcal mol^{-1} . O $E_T(30)$ calculado para H3TM04 no CHQ e CHQ-SDS foi de 57,5 e 54,7 kcal mol^{-1} , respectivamente. Considerando que o $E_T(30)$ da água é 61,1 kcal mol^{-1} e do dioxano é 36,1 kcal mol^{-1} , o H3TM04 encontra-se num microambiente menos polar no CHQ-SDS que no CHQ. Além disso, esses resultados demonstram que o H3TM04 se encontra dentro das Nps, indicando que as cadeias hidrofóbicas dodecil do SDS incrementam os nichos hidrofóbicos no particulado.

3.2 Liberação de H3TM04 - estudo *in vitro*

Estudos de liberação e cinética *in vitro* foram realizados para determinar a capacidade dessa nova formulação em modular a liberação do composto ativo (FIGUEIREDO et al., 2017; WONG; CHOI, 2015). A Figura 43 mostra o perfil de liberação do H3TM04 encapsulado nas Nps de CHQ-SDS e o H3TM04 livre em acetonitrila durante um período de 72 h. Nas primeiras

5 h, $98,3 \pm 0,1\%$ do H3TM04 não encapsulado foi liberado e apenas $2,4 \pm 0,2\%$ do H3TM04 foi liberado das Nps, verificando-se o processo de liberação controlada do composto quando encapsulado. Nas Nps, a liberação do H3TM04 aumentou para $24,9 \pm 3,1\%$ após 24 h. A liberação continuou aumentando gradualmente, até atingir $86,6 \pm 11,3\%$ após 72 h.

Figura 43. Perfil de liberação *in vitro* de H3TM04 de (●) CHQ-SDS e (●) H3TM04 livre em tampão pH 7,4 com dodecil sulfato de sódio a 0,5% (m/v) para atingir as condições *Sink*. Os resultados são mostrados como a média \pm DP de pontos em triplicata e as linhas as linhas sólidas servem apenas como guia visual.



De acordo com a literatura, a entrega controlada de um composto ativo é uma característica dos derivados de quitosana. Por exemplo, Zhang et al., relataram um perfil de liberação controlado em torno de 72 h para docetaxel em Nps de carboximetil quitosana (ZHANG et al., 2017). Resultados semelhantes foram relatados na liberação de DOX em Nps de CHQ, onde aproximadamente 60% do DOX foi liberado ao longo de 72 h. O perfil de liberação obtido neste estudo indica que as Nps de CHQ-SDS podem ser utilizadas para o fornecimento controlado de H3TM04 ou fármacos terapêuticos com estrutura molecular semelhante. A liberação controlada do fármaco ativo, é um fator muito importante no tratamento contra o câncer, pois uma liberação rápida poderia promover exposição sistêmica, levando efeitos colaterais (WANG et al., 2017). Esta situação é muitas vezes o motivo, da falha nas quimioterapias, uma vez que as concentrações do fármaco podem flutuar amplamente entre o nível sub-terapêutico e o nível tóxico do fármaco durante o tempo de administração, tornando necessário fornecer o composto ativo continuamente ao paciente. Além disso, os efeitos colaterais causados pelo fármaco livre, como a morte de células da medula óssea, podem proibir

a finalização do tratamento por parte do paciente. Por outro lado, na liberação controlada, a concentração do fármaco não apresenta essas flutuações, gerando efeitos benéficos como; menor quantidade de fármaco fornecido, menos efeitos colaterais e finalização do tratamento terapêutico por parte do paciente (UHRICH et al., 1999).

A liberação do fármaco pode ocorrer por meio de um mecanismo complexo que envolve vários processos, como difusão de água na matriz polimérica, intumescimento do polímero, dissolução do fármaco, degradação e/ou erosão do polímero (KAMALY et al., 2016; LANGER, 1990). Para determinar a cinética associada e o mecanismo de liberação do H3TM04, os modelos de ordem zero, pseudo-primeira ordem, Higuchi e lei de potência foram aplicados aos dados de liberação do fármaco (DAS; KASOJU; BORA, 2010; MUHSIN et al., 2016; TIĞLI AYDIN; PULAT, 2012). A Tabela 2 apresenta as constantes de liberação, expoente de liberação (n) e coeficientes de regressão linear (R^2) dos modelos aplicados.

O mecanismo envolvido na liberação do H3TM04 das Nps de CHQ-SDS foi governado pelo modelo de lei de potência (melhor ajuste, com $R^2=0,9991$). A constante da velocidade de liberação aparente do modelo da lei de potência e o expoente de liberação (n) foram $1,44 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ e 1,327, respectivamente. O baixo valor da constante de velocidade confirma que a liberação do H3TM04 ocorreu numa taxa lenta (MUHSIN et al., 2016).

Os mecanismos associados à liberação do composto podem ser conhecidos a partir do valor do expoente de liberação (n): onde $n=0,45$ corresponde a um mecanismo de difusão Fickiana ou liberação controlada por difusão; $n=0,45-0,89$ corresponde ao transporte não-Fickiano (difusão anômala) ou liberação controlada por difusão e erosão; $n=0,89$ refere-se a um mecanismo de caso II (determinado pelo relaxamento de polímero ou o processo de intumescimento; e $n > 0,89$ refere-se a um mecanismo de super caso II (transporte ou liberação do composto por erosão) (DAS; KASOJU; BORA, 2010; MUHSIN et al., 2016). Portanto, de acordo com os resultados do expoente de liberação, a liberação do H3TM04 nas Nps de CHQ-SDS ocorre por meio de um mecanismo controlado por erosão.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da liberação de H3TM04 de nanopartículas de CHQ-SDS em tampão pH 7,4 com dodecil sulfato de sódio a 0,5% (m/v).

Modelos matemáticos para cinética de liberação do H3TM04								
Ordem zero		Pseudo-primeira		Higuchi		lei de potência		
k_0 ($10x^{-2} h^{-1}$)	R^2	k_1 ($10x^{-2} h^{-1}$)	R^2	k_H ($10x^{-2} h^{-1}$)	R^2	k ($10x^{-5} h^{-1}$)	R^2	n
1,224	0,9893	5,624	0,8405	1,060	0,8652	1,440	0,9901	1,327

k_0 , k_1 , k_H e k são as constantes de taxa de liberação aparente dos respectivos modelos matemáticos e n é o expoente de liberação do modelo da lei de potência.

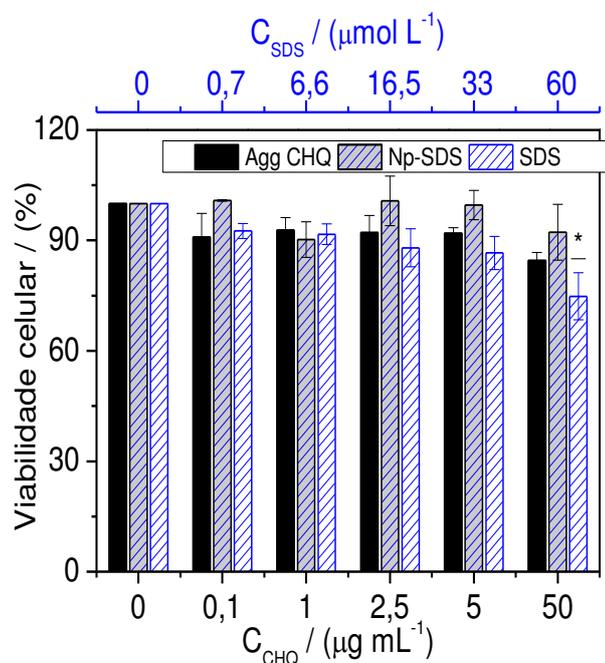
De acordo com o modelo da lei de potência, o mecanismo de liberação controlado pela erosão das Nps, depende de dois fatores: i) a difusão anômala não-Fickiana (isto é, uma difusão não diretamente proporcional ao gradiente de concentração) e ii) a erosão e desaglomeração das nanopartículas. A difusão anômala depende de vários fatores, como o grau de intumescimento, dissolução de cadeias poliméricas e alterações morfológicas na matriz polimérica (KAMALY et al., 2016; MU et al., 2016). Ao mesmo tempo que acontece o intumescimento das nanopartículas, incrementa a concentração de água no particulado tornando pouco favoráveis as interações polímero-polímero, e levando à separação das cadeias poliméricas e à lenta desaglomeração da nanopartícula. Este mecanismo de entrega foi relatado para outros sistemas de biopolímeros, e é apropriado para entrega controlada de drogas devido à proteção do fármaco do microambiente fora da nanopartícula (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017; KAMALY et al., 2016).

3.3 Efeito citotóxico das nanopartículas de CHQ-SDS com H3TM04 frente às linhas celulares de leucemia

Apesar de sua ampla aplicação, o SDS é considerado um surfactante tóxico, limitando seu uso nos campos farmacêuticos e biológicos (DONG et al., 2009). Ensaio de citotoxicidade são amplamente utilizados para avaliar a possível aplicação de Nps em sistemas biológicos (AMOOZGAR et al., 2012; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2017). A linhagem de células Jurkat foi utilizada para avaliar a citotoxicidade dos nanoagregados de CHQ, Nps de CHQ-SDS e SDS livre sem a presença de H3TM04. A Figura 44 apresenta os resultados de viabilidade celular das células Jurkat expostas a diferentes concentrações de CHQ (0 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e SDS (0 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 24 h de incubação.

Os resultados evidenciaram que o SDS na concentração de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ é citotóxico para as células Jurkat, uma vez que reduziu significativamente a viabilidade celular quando é comparado com o grupo controle ($*p \geq 0,05$). No entanto, os nanoagregados de CHQ e as Nps de CHQ-SDS não são citotóxicos frente as células Jurkat nas concentrações testadas, uma vez que nenhum efeito notável na viabilidade celular foi observado e não houve diferença significativa com relação ao grupo de controle. Assim, as Nps de CHQ-SDS são biocompatíveis com as células Jurkat e podem ser aplicadas em ensaios biológicos.

Figura 44. Citotoxicidade dos agregados de CHQ (Agg CHQ), nanopartículas de CHQ-SDS e SDS frente a linha celular de leucemia Jurkat por 24 h. Os resultados são a média \pm DP de pelo menos 4 experimentos independentes. $*p \geq 0,05$ em comparação aos grupos controle, usando um ANOVA, seguido do teste post-hoc de Bonferroni

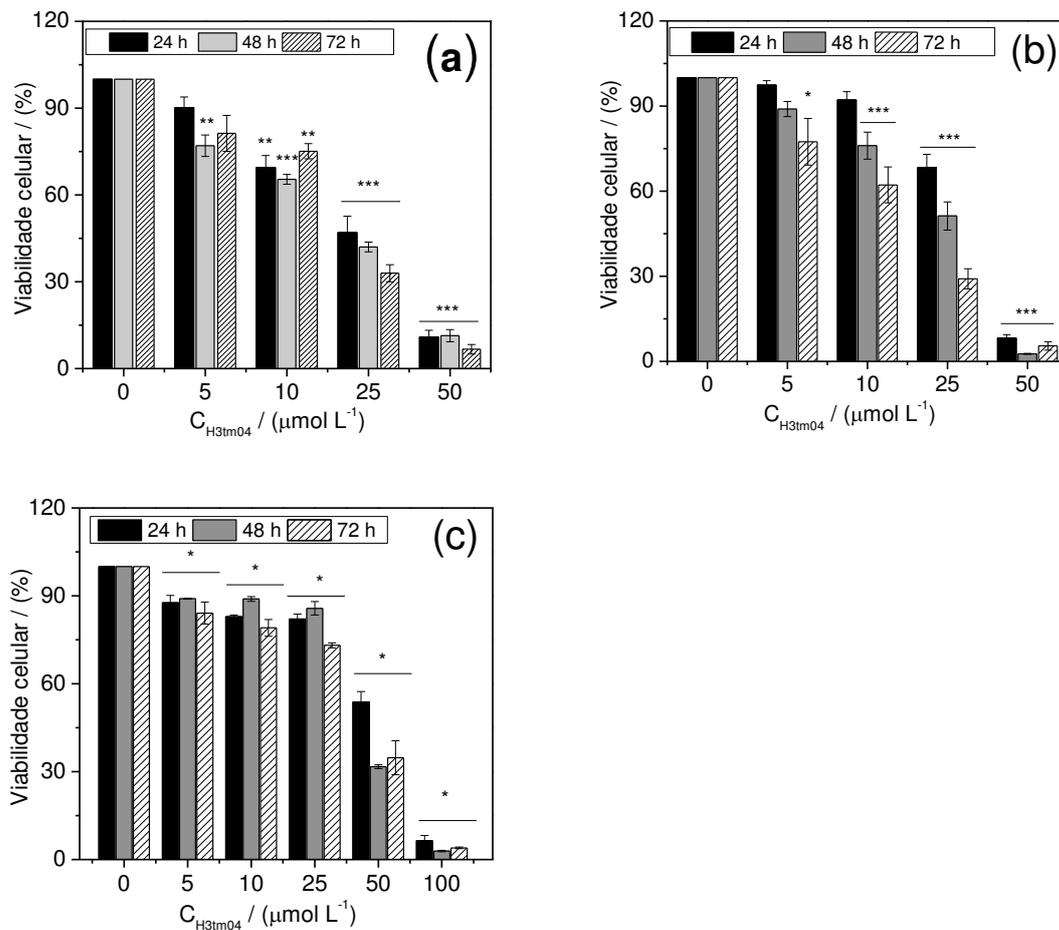


Calejo et al., demonstraram que a toxicidade dos surfactantes da lisina frente às células HeLa é reduzida na presença de etil(hidroxi)etil celulose devido à interação favorável entre o biopolímero e o surfactante, levando à formação de micelas mistas (CALEJO et al., 2013). Assim, os monômeros de surfactante encontram-se menos disponíveis para interagir com a membrana celular, diminuindo a toxicidade (CALEJO et al., 2013). Portanto, as Nps de CHQ-SDS com $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SDS não são tóxicas para as células Jurkat. Com base na interpretação descrita por Calejo et al., a forte interação CHQ-SDS, as moléculas de SDS encontram-se

menos disponíveis para interagir com a membrana celular, reduzindo a ocorrência de morte celular. A interação favorável CHQ-SDS foi relatada por Chamorro et al. (RENGIFO et al., 2019), encontrando que a interação hidrofóbica entre o CHQ e o SDS promove a agregação e formação das Nps, diminui o raio hidrodinâmico e aumenta a estabilidade dos nanoagregados em solução aquosa. Assim, as Nps de CHQ-SDS podem ser aplicadas para controlar a entrega do H3TM04 em células leucêmicas na faixa de concentração testada.

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico do H3TM04 encapsulado nas CHQ-SDS-H, foram realizados ensaios de MTT em dois tipos de linhas celulares de leucemia: Jurkat e K-562 e de melanoma de camundongo B16F10. As células foram incubadas com as Nps de CHQ-SDS em diferentes concentrações de H3TM04 (5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 24, 48 e 72 h (Figuras 45).

Figura 45. Citotoxicidade de H3TM04 encapsulado nas nanopartículas de CHQ-SDS frente dois tipos de linha celular de leucemia: a) Jurkat, (b) K-562 (c) B16F10. Os resultados são a média \pm DP de pelo menos 4 experimentos independentes. * $p \geq 0,05$; ** $p \geq 0,01$; *** $p \geq 0,001$ em comparação aos grupos controle, usando um ANOVA, seguido do teste post-hoc de Bonferroni.



As Nps de CHQ-SDS-H induziram um efeito citotóxico em ambas as linhagens de células de leucemia e de melanoma, de maneira dependente da concentração e do tempo. Estes resultados permitiram calcular os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 3 e compará-los com os valores de H3TM04 livre, reportados anteriormente por Stefanés *et al* (STEFANES *et al.*, 2019).

Tabela 3. Valores de IC₅₀ para H3TM04 livre e encapsulado nas Nps de CHQ-SDS frente às células K-562 e Jurkat, com tempos de incubação de 24, 48 e 72 h.

Tempo de incubação (h)	IC ₅₀ H3TM04 (μmol L ⁻¹) ^a		IC ₅₀ H3TM04(μmol L ⁻¹) ^a	
	Jurkat	K-562	Jurkat	K-562
24	32,05 ± 1,06	30,77 ± 0,59	19,32 ± 1,01	31,78 ± 2,64
48	16,19 ± 0,32	17,22 ± 0,60	15,53 ± 0,57	19,91 ± 1,45
72	15,13 ± 1,05	15,65 ± 0,51	15,69 ± 0,98	12,26 ± 0,69

Células de camundongo B16F10		
	IC ₅₀ H3TM04(μmol L ⁻¹) ^a	
24	98,7 ± 1,6	45,8 ± 2,3
48	72,7 ± 2,4	37,8 ± 2,4
72	62,5 ± 1,3	31,5 ± 1,5

^aValores de IC₅₀ reportados por Stefanés *et al* (STEFANES *et al.*, 2019)

Os resultados de IC₅₀ para o H3TM04 na forma livre e dentro das Nps de CHQ-SDS-H contra ambas as células testadas são similares por 24, 48 e 72 h de incubação, exceto para as células Jurkat após 24 h e K-562 após 72 h incubação. No caso das células Jurkat, o IC₅₀ para as Nps de CHQ-SDS-H é menor (19,32 ± 1,01 μmol L⁻¹) em comparação com o composto livre (32,05 ± 1,06 μmol L⁻¹), indicando que as Nps CHQ-SDS aumentam a citotoxicidade do H3TM04 em relação às células Jurkat. Além disso, considerando que menos de 30% do H3TM04 foi liberado das nanopartículas em tampão fosfato pH 7,4 ao longo de 24 h (Figura 43), a citotoxicidade do H3TM04 é maior quando está encapsulado.

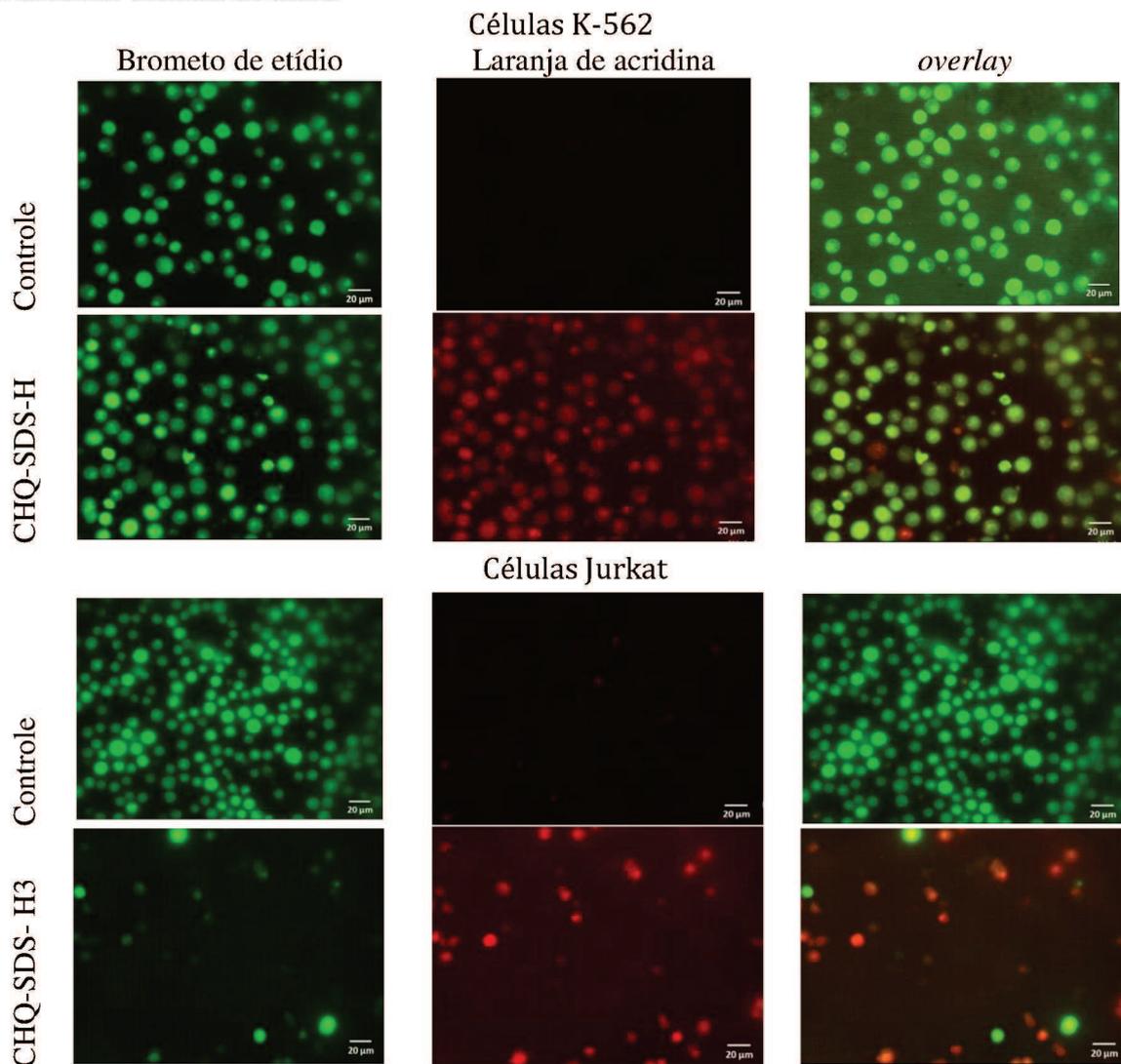
É importante ressaltar que para as células K-562, a maior diferença nos valores de IC₅₀ do composto livre (15,65 ± 0,51 μmol L⁻¹) e o composto encapsulado (12,26 ± 0,69 μmol L⁻¹) foi observada apenas após 72 h de incubação. Esta diferença entre os resultados obtidos para as duas linhagens celulares pode ser explicada pelas particularidades de cada tipo de célula. A

célula K-562 é classificada como leucemia mielóide crônica em crise blástica que tende a ser mais agressiva e resistente ao tratamento do que as células Jurkat (MAIORAL et al., 2013).

Por outro lado, nas células de melanoma, quando o H3TM04 foi incorporado nas Nps, os valores de IC_{50} diminuíram aproximadamente 50% em relação aos do composto livre (Tabela 3), indicando que proporcionaram uma entrega controlada do H3TM04 nas células de melanoma. Independentemente do tempo de incubação, as Nps mostraram-se mais ativas que o composto livre, possivelmente pelo aumento da taxa de internalização celular.

A capacidade das Nps contendo H3TM04 para induzir alterações morfológicas nas células Jurkat e K-562 foi avaliada utilizando a marcação com acridina laranja/brometo de etídio (Figura 46).

Figura 46. Detecção do apoptose em células K-562 e Jurkat utilizando o ensaio de marcação com laranja de acridina / brometo de etídio.



As células controle, quando estão marcadas com laranja de acridina, exibiram coloração verde e integridade dos núcleos celulares, indicando viabilidade celular. As células tratadas com Nps de CHQ-SDS-H por 24 h apresentaram alterações morfológicas quando comparadas com as células controle. Nas células verdes, a membrana encontra-se intacta, mas apresenta condensação da cromatina e fragmentação nuclear. As células marcadas com brometo de etídio (cor laranja/vermelho) perderam a integridade da membrana, sugerindo o mecanismo de apoptose como foi demonstrado por Natalia et al. (STEFANES et al., 2019) ao usar o H3TM04 livre nestas linhagens celulares. Estes resultados permitem concluir que as Nps entregam ou liberam o composto ativo H3TM04 nas células Jurkat e K-562.

CAPÍTULO IV

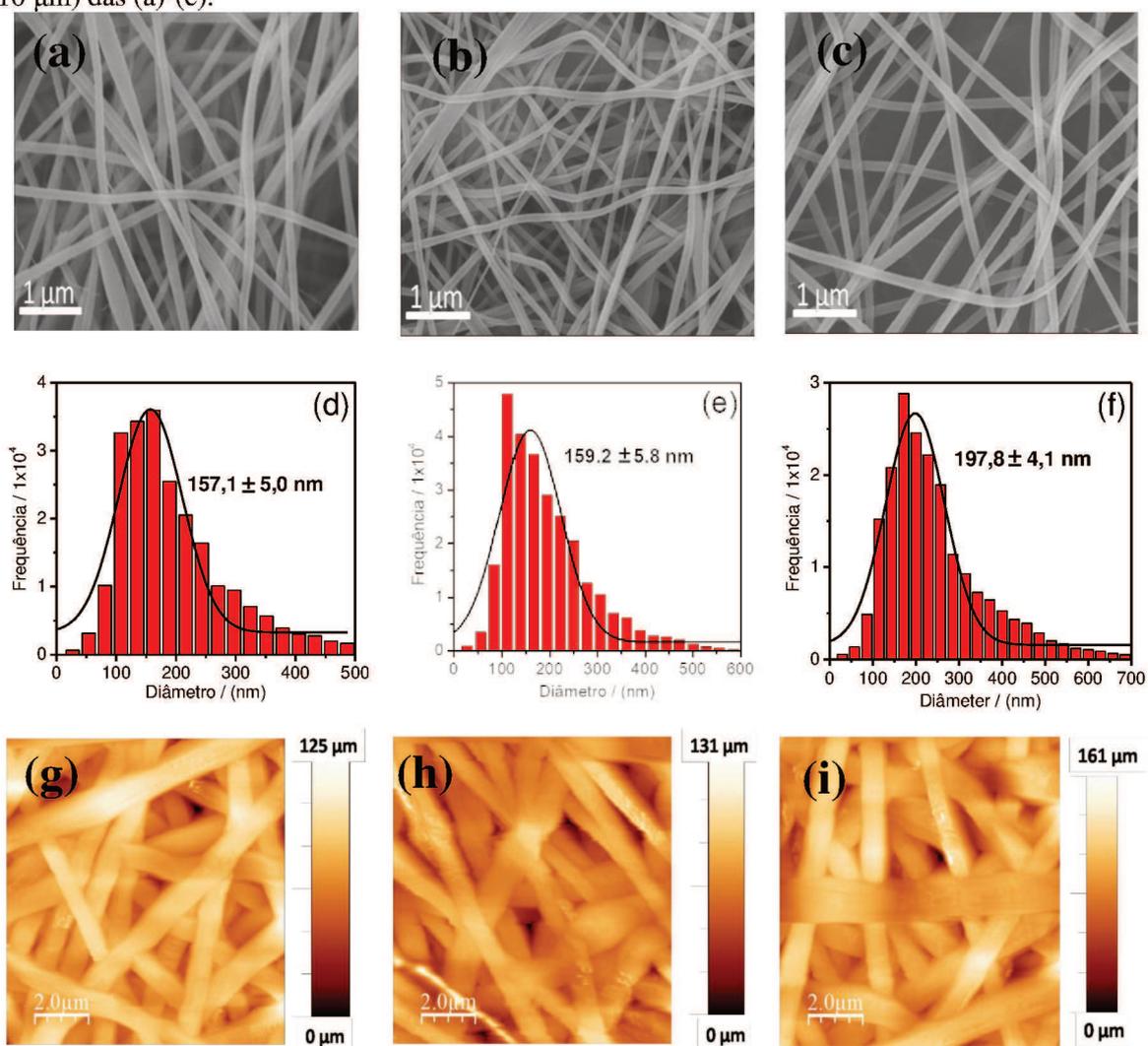
4 NANOFIBRAS DE PEO-QUITOSANA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE CARBOXIMETIL HEXANOIL QUITOSANA/DODECIL SULFATO CONTENDO A PIRAZOLINA H3TM04

Neste capítulo, Nps de CHQ-SDS-H foram dispersas em Nfs de PEO-quitosana (PEOChNp) biodegradáveis. O nanomaterial foi formado por co-eletrospinning em solução aquosa. As propriedades estruturais e morfológicas das Nfs PEOChNp foram investigadas por FEG-SEM, TEM, AFM, FTIR, DSC e TGA. As Nfs PEOChNps mostraram uma estreita distribuição de tamanho ($197,8 \pm 4,1$ nm) com distribuição homogênea das Nps no interior das Nfs. A liberação controlada do H3TM04 da dupla barreira (Nps/Nfs) acontece por mecanismos de difusão e erosão durante 120 h. Além disso, a taxa de transferência do H3TM04 através da epiderme (liberação *ex vivo*) também foi avaliada quando as Nfs de PEOChNp são utilizadas como carreador. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que a incorporação do H3TM04 nas Nps aumenta o efeito citotóxico sobre células de melanoma B16F10. Estes resultados sugerem que as Nfs propostas podem ser usadas para liberação controlada de fármacos na quimioterapia local da pele.

4.1 Morfologia de nanofibras formadas.

A encapsulação do H3TM04 livre e a dispersão das Nps de CHQ-SDS-H nas Nfs de PEOCh podem alterar a morfologia das Nfs, medidas de FEG-SEM e AFM foram realizadas para cada tipo de Nf. A Figura 47 (a-f) apresenta as imagens de FEG-SEM da Nfs (PEOCh, PEOCh-H3, PEOChNp) preparadas por eletrofiação, assim como também é reportada a distribuição de diâmetro correspondente.

Figura 47. Morfologia e distribuição de diâmetro das nanofibras de PEOCh, PEOCh-H3 e PEOChNp. Imagens de FEG-SEM (a) PEOCh, (b) PEOCh-H3, (c) PEOChNp. (d-f): Distribuição de tamanho correspondente das nanofibras (a)-(c). (g-i): Imagens de AFM correspondentes (área escaneada: $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) das (a)-(c).

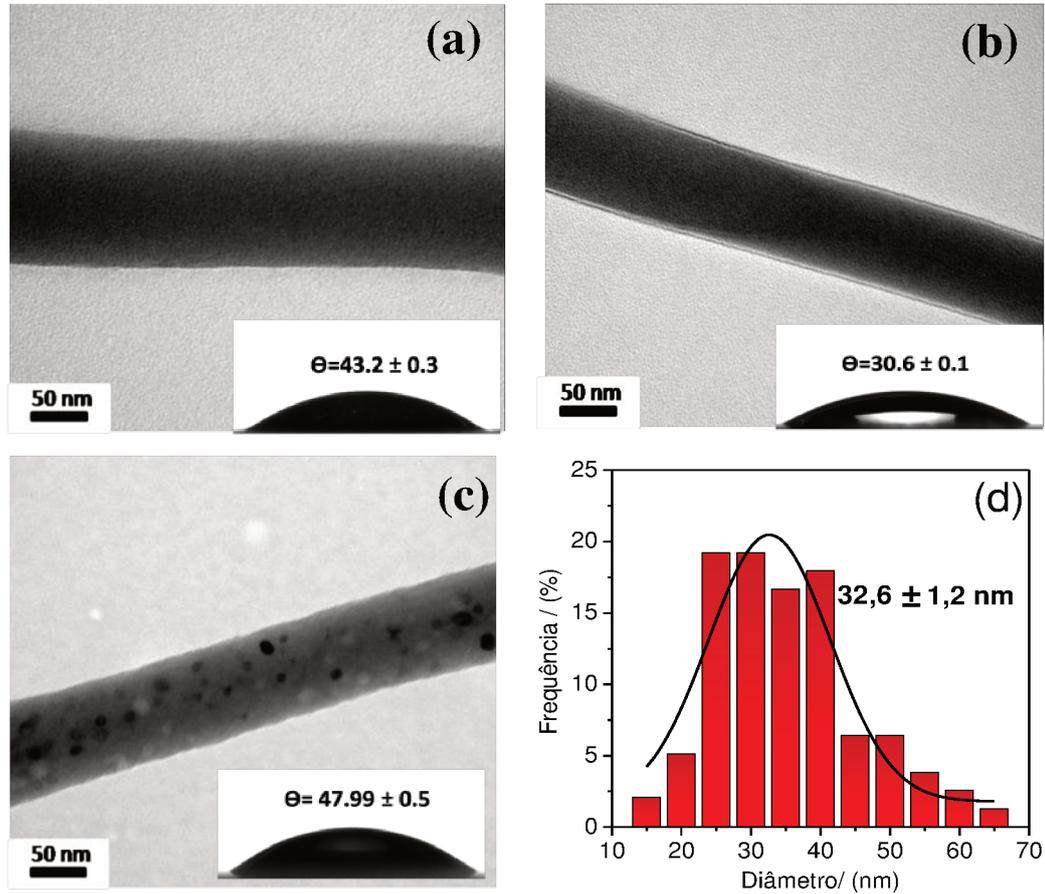


As Nfs mostraram-se contínuas, sem *beads*, geometricamente uniformes e com superfície regular. O diâmetro médio das Nfs de PEOCh é de $157,1 \pm 5,0$ nm. A encapsulação do H3TM04 livre nas Nfs de PEOCh (PEOCh-H3) aumentou o valor médio da distribuição de tamanho em aproximadamente 2 nm ($159,2 \pm 5,8$ nm, Figura 47e.); porém, esta diferença não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, a distribuição de diâmetro das Nfs PEOChNp apresentou um aumento considerável do diâmetro médio ($197,8 \pm 4,1$ nm), sugerindo que as Nps foram incorporadas com sucesso nas Nfs. Imagens amplificadas de FEG-SEM não mostraram diferenças morfológicas entre as três Nfs (Figura S1. Anexo D). Imagens de AFM confirmaram a morfologia cilíndrica das Nfs e evidenciaram a topografia dos nanomateriais (Figura 47 (g-i)). As Nfs mostraram uma rede contínua e tridimensional semelhante à matriz extracelular (Figura S2. Anexo D) (KENRY; LIM, 2017). O tamanho aparente das Nfs por AFM (600 a 1200 nm) foi superior aos valores obtidos por FEG-SEM, provavelmente devido ao efeito de colisão das fibras próximas. O perfil de AFM de uma Nf de PEOCh, quando comparado ao FEG-SEM da mesma amostra, mostrou que isto acontece pelo emaranhamento de várias Nfs (Figura S3. Anexo D).

As Nfs de PEOChNp apresentaram uma superfície lisa e sem aglomeração de Nps, indicando que as Nps de CHQ-SDS-H não se acumulam em altas proporções na superfície das Nfs e exibem uma distribuição preferencial dentro das mesmas. Estes resultados foram comprovados por TEM (Figura 48c), onde as imagens obtidas mostraram que as Nps de CHQ-SDS-H têm uma distribuição uniforme dentro das Nfs de PEOCh.

As Nps apresentam morfologia esférica dentro das Nfs com tamanho médio de $32,6 \pm 1,2$ nm (Figura 48d), e nenhuma Np fora das Nfs foi observada. No capítulo 2, foi reportado o diâmetro médio das Nps de CHQ-SDS-H fora das Nfs por TEM ($70,1 \pm 2,3$ nm). O tipo de preparação das Nps pode explicar as diferenças de tamanho. Durante o processo de eletrofiação, as Nps foram comprimidas ou o baixo contraste das Nps dentro das Nfs não permitiu identificar exatamente a interface do material. Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que relata uma distribuição homogênea de Nps poliméricas dentro de Nfs poliméricas. As imagens de TEM das Nfs de PEOCh e PEOCh-H3 mostraram uma densidade uniforme, sugerindo uma estrutura homogênea, onde os unímeros de quitosana e as moléculas de H3TM04 estão distribuídas uniformemente pela matriz do PEO (Figuras 48a e 48b). A reprodutibilidade do material foi avaliada coletando amostras em diferentes tempos, entre 2 e 8 h, demonstrando que as Nps encontram-se distribuídas no nanomaterial (Figura S4. Anexo D).

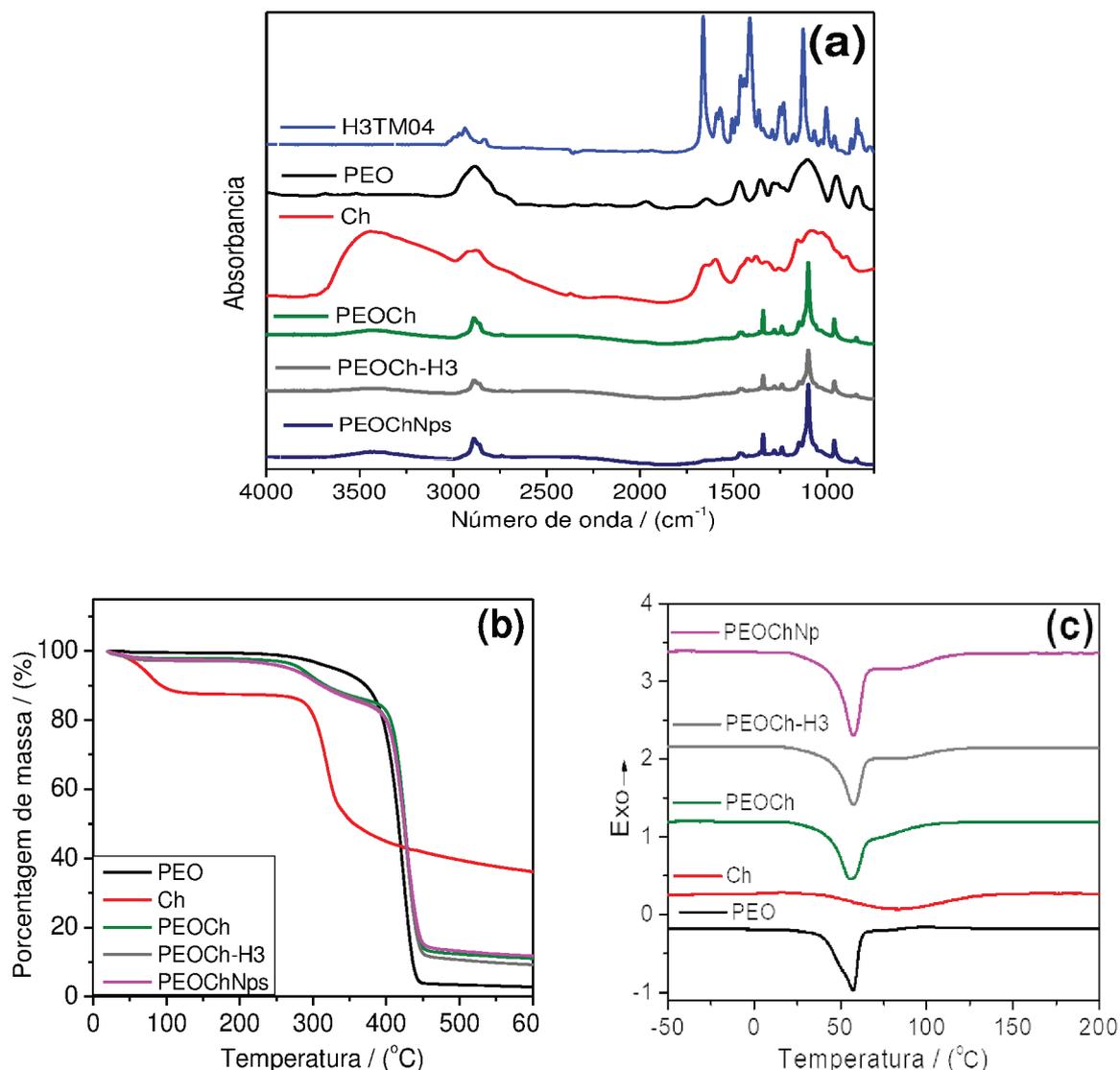
Figura 48. Imagens de TEM das nanofibras de (a) PEOCh, (b) PEOCh-H3, (c) PEOChNp. Dentro de cada imagem de TEM encontra-se o ângulo de contato da água com o nanomaterial correspondente. (d): distribuição de diâmetro da nanopartículas de CHQ-SDS-H dentro das nanofibras de PEOChNp.



As interações entre as Nfs e pele são influenciadas pela molhabilidade da superfície das Nfs, o qual afeta a taxa de transferência do H3TM04 das Nfs para a pele. A presença de H3TM04 nas Nfs de PEOCh reduziu o ângulo de contato de $43,2 \pm 0,3$ para $30,6 \pm 0,1$ (Figuras 48a e 48b). A interação favorável H3TM04-quitosana no interior das Nfs e o aumento da concentração de PEO superfície das Nfs explicariam a redução no ângulo de contato, bem como a natureza hidrofóbica do H3TM04. Por outro lado, o ângulo de contato é $47,99 \pm 0,5$ (Figura 48c) quando o H3TM04 encontra-se nas Nps CHQ-SDS-H e disperso nas Nfs. Nessa situação, é de esperar que não há interação do H3TM04 com os polímeros PEO e quitosana. Por tanto, as cadeias hidrocarbônicas dos grupos hexanoil da CHQ e do SDS na interface das Nps aumentariam a hidrofobicidade na superfície das Nfs, e assim, o incremento do ângulo de contato.

Os espectros de FTIR (Figura 49a) dos compostos H3TM04, PEO, quitosana, e as Nfs PEOCh, PEOCh-H3 e PEOChNp foram obtidos para avaliar a estrutura química das Nfs.

Figura 49. Caracterização de H3TM04 (azul), quitosana pura (vermelho), PEO puro, nanofibras de PEOCh (verde), PEOCh-H3 (cinza) e PEOChNp (rosa) por: a) Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), b) Análise termogravimétrica e c) Calorimetria diferencial de varredura (DSC).



O espectro de FTIR de quitosana pura apresentou as bandas características, as quais foram analisados no capítulo 2. No espectro de FTIR do PEO, a absorção em 2885 cm⁻¹ foi atribuída ao alongamento das unidades CH₂, e picos agudos em 1461 e 1356 cm⁻¹ foram atribuídos à deformação de C-H dos grupos metila. Bandas em 1272 e 1095 cm⁻¹ estão relacionadas às vibrações de estiramento C-O-C. Nas Nfs (PEOCh, PEOCh-H3 e PEOChNp), bandas características de quitosana e de PEO podem ser observadas, onde a banda em torno de

3405 cm^{-1} corresponde ao alongamento N-H e O-H da quitosana. As bandas em 1341 e 1096 cm^{-1} correspondem à deformação C-H dos grupos metila, e as vibrações de estiramento C-O-C do PEO, respectivamente (RENGIFO et al., 2019).

A presença do H3TM04 nas Nfs PEOCh-H3 e PEOChNp não foi detectada por espectroscopia ATR-FTIR e/ou FTIR, o que pode ser atribuído à baixa concentração do composto na fase polimérica.

Medidas de TGA das matérias-primas e das nanofibras foram realizadas (Figura 49b). Para a quitosana, dois eventos de perda de massa na faixa de 60-113 °C e 261-590 °C foram observados. O primeiro evento de perda de massa ocorre pela evaporação da água aprisionada na quitosana, enquanto o segundo é atribuído à degradação das cadeias da quitosana e à formação de resíduo carbonoso (36%). Por outro lado, a perda de massa de PEO (95%) na faixa de 267-470 °C deve-se à sua decomposição, o qual já é relatado na literatura por Darbasizadeh et al. (DARBASIZADEH; MOTASADIZADEH; FOROUGHI-NIA, 2018). As Nfs mostraram os dois eventos característicos de perda de massa anteriormente atribuídos aos polímeros: degradação da quitosana (entre 265–380 °C) e PEO (entre 386–460 °C). Por outro lado, as Nfs ($T_{\text{max}} = 428,5$ °C) foram mais estáveis do que os polímeros isoladamente ($T_{\text{max}} \text{ PEO} = 424,2$ °C e $T_{\text{max}} \text{ quitosana} = 318,3$ °C). A inclusão de Nps ou H3TM04 nas Nfs não resultou em nenhuma diferença relevante no perfil térmico.

O comportamento térmico das Nfs também foi avaliado por DSC (Figura 49c). O PEO exibiu um pico endotérmico em 57,24 °C atribuído à temperatura de fusão do polímero. Por sua vez, a quitosana, apresentou um pico endotérmico em 84,01°C, atribuído à evaporação da água aprisionada (também observada na análise de TGA). Nas Nfs, o ponto de fusão do PEO é aproximadamente o mesmo, indicando que não foram observadas alterações substanciais.

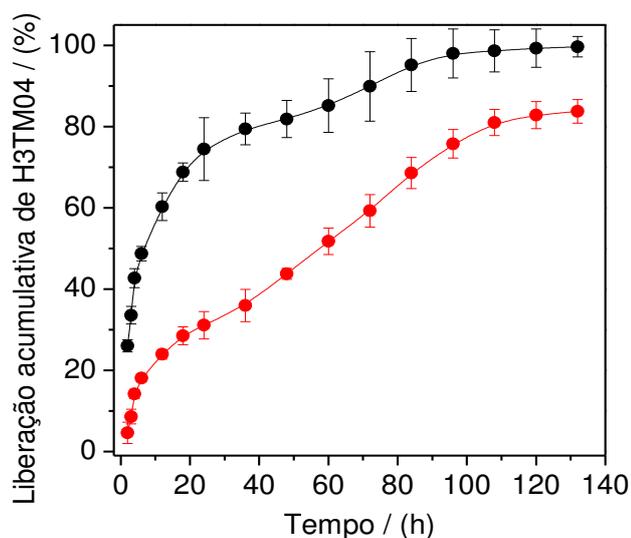
4.2 Eficiência de encapsulação (% EENfs) e estudo de liberação *in vitro* do H3TM04

O % EENfs de H3TM04 nas Nfs (PEOCh-H3, $84,11 \pm 0,23\%$) foi superior ao % EENfs obtido para as Nps de CHQ-SDS-H dispersas nas Nfs (PEOChNp, $79,45 \pm 0,48\%$). A metodologia utilizada para encapsular o H3TM04 e depois dispersá-lo nas Nfs teve mais etapas do que a dispersão do fármaco livre, o que justificaria o % EE obtido. O fato é que, comparando

com a literatura, a quantidade encapsulada é maior do que a usual para Nfs de quitosana (CHEN; HUANG, 2016; MENG et al., 2016).

A liberação *in vitro* do composto a partir de PEOCh-H3 inicialmente teve um *burst* seguido da liberação de aproximadamente 80% do composto nas primeiras 24 h (Figura 50).

Figura 50. Perfil de liberação *in vitro* de H3TM04 em (●) nanofibras PEOCh-H3 e (●) nanofibras PEOChNp em tampão fosfato pH 7,4 com 0,5% (m/v) de SDS para atingir as condições *Sink*. Os resultados são apresentados como o valor médio \pm DP de 3 experimentos independentes, as linhas solidas apenas servem como guia visual.



Quando o composto encontra-se no sistema PEOChNp, o *burst* inicial foi menor e a liberação nas primeiras 24 h foi de apenas 20%. O *burst* inicial pode ser atribuído a moléculas de H3TM04 que já foram liberadas das Nps, no processo de eletrofiação, mas ainda permanecem aprisionadas nas Nfs. Após 132 h, 80% da quantidade total de H3TM04 encapsulado foi liberado do sistema PEOChNp, enquanto, quase 100% foi liberado das Nfs PEOCh-H3. Estes resultados indicaram que o encapsulamento do composto nas Nps e previamente disperso nas Nfs foi capaz de proporcionar uma liberação lenta e contínua do composto ativo, o qual é desejável para sistemas de liberação controlada.

Quatro modelos cinéticos (ordem zero, pseudo-primeira ordem, modelo de Higuchi e modelo lei de potência) foram considerados para avaliar o mecanismo de liberação do H3TM04 das Nfs e os parâmetros cinéticos foram calculados ajustando os modelos aos dados experimentais (Figura S6. Anexo D). Os valores da constante de liberação, expoente de liberação (n) e coeficientes de regressão (R^2) foram calculados separadamente (Tabela 4). O modelo de Higuchi mostrou o melhor ajuste para ambos os sistemas, mas a modelo lei de potência também ofereceu um bom ajuste.

Tabela 4. Parâmetros de liberação do H3TM04 nas Nfs de PEOCh-H3 e PEOChNp.

Nfs	Modelos matemáticos								
	Ordem zero		Pseudo-primeira		Higuichi		lei de potência		
	k_0 ($10x^{-3} h^{-1}$)	R^2	k_1 ($10x^{-2} h^{-1}$)	R^2	k_H ($10x^{-2} h^{-1}$)	R^2	k ($10x^{-2} h^{-1}$)	R^2	n
PEOCh-H3	4,86	0,8652	0,07	0,8112	10,54	0,9778	26,71	0,9767	0,95
PEOChNp	6,04	0,9856	1,66	0,8718	6,50	0,9966	4,59	0,9820	0,58

k_0 , k_1 “ k_H ” e “ k ” representa as constantes aparentes de liberação respectivas para cada modelo matemático, e n é a constante de liberação do modelo lei de potência.

O modelo lei de potência supõe que a difusão do composto da matriz polimérica acontece somente num único plano da matriz (DARBASIZADEH; MOTASADIZADEH; FOROUGHNI-NIA, 2018). O valor, $n = 0,95$ foi obtido para as Nfs PEOChH3, indicando que a liberação H3TM04 foi controlada pela erosão das Nfs poliméricas. No processo de erosão, o intumescimento, a difusão do composto e a degradação do polímero também devem acontecer e afetar o processo de liberação.

Nanosistemas de polímeros hidrofílicos, como PEO e quitosana, absorvem água promovendo o intumescimento e a liberação inicial do composto na interface das nanofibras (liberação inicial, *burst*). Subsequentemente, a superfície é corroída, seguida por uma difusão contínua e controlada do H3TM04 (Figura 50). Um perfil semelhante foi encontrado na entrega de cloridrato de ranitidina a partir de Nfs de quitosana/PEO em pH 6,8 (DARBASIZADEH; MOTASADIZADEH; FOROUGHNI-NIA, 2018). Para o PEOChNp, o melhor ajuste dos dados experimentais foi obtido com modelo de Higuichi, que assume que a liberação do composto ocorre por um mecanismo de difusão Fickiana, assim como também: i) A quantidade de H3TM04 nas Nfs é maior que a solubilidade do H3TM04 no meio de liberação, ii) As Nfs são muito maiores do que as moléculas H3TM04, iii) O H3TM04 difunde a uma taxa constante (proporcional ao gradiente de concentração) e, iv) A liberação é limitada pelas condições *Sink* do sistema (CHEN; HUANG, 2016). Por outro lado, os dados experimentais também apresentam uma boa correlação com o modelo lei de potência, indicando uma difusão anômala não-Fickiana. Este resultado oposto, pode ser explicado pelo *burst* inicial (um fenômeno não

abordado por qualquer um dos modelos aplicados), sendo assim uma mistura de mecanismos, tanto Fickiano quanto não-Fickianos. Portanto, a complexidade da dupla barreira de liberação (Nps/Nfs) mascara o mecanismo real de liberação de composto ativo.

4.3 Estudo de permeação de pele humana *ex vivo*

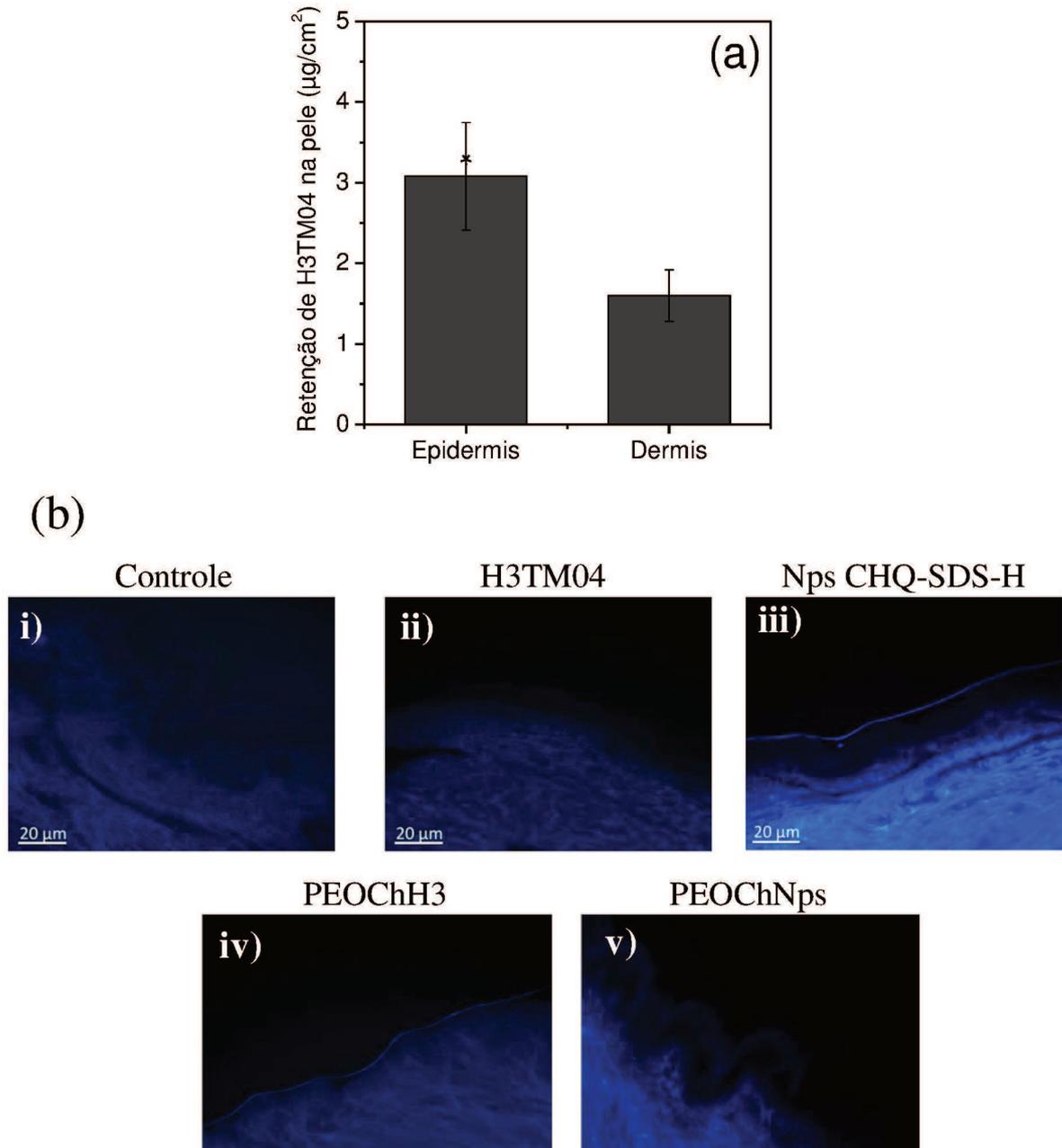
O estudo de permeação cutânea foi realizado para avaliar o efeito das Nps e Nfs na permeação do H3TM04 através das camadas de pele humana. A quantidade de H3TM04 permeada foi avaliada a partir de uma solução de propilenoglicol (H3TM04 livre) e da suspensão das Nps CHQ-SDS-H. Após 7 h, o H3TM04 não foi detectado no fluido receptor; no entanto, foi quantificado na pele tratada com Nps (Figura 51a).

A alta massa molar do H3TM04 ($408,17 \text{ g mol}^{-1}$) provavelmente dificultou a permeação/retenção na pele quando é aplicado na solução de propilenoglicol (IQBAL et al., 2018). As Nps, por sua vez, aumentaram a retenção do H3TM04 em ambas as camadas da pele (derme e epiderme). Estudos de literatura têm relatado um aumento na permeação cutânea de moléculas quando elas são incorporadas em nanocarreadores (KHAN et al., 2015; PALMER; DELOUISE, 2016). Características de Nps, tais como composição, tamanho, forma e eficiência de encapsulação de fármacos estão frequentemente relacionadas com o grau de permeação. Estes sistemas podem aumentar a permeabilidade da pele, principalmente aumentando a solubilização do fármaco, dividindo o fármaco nas camadas da pele e/ou proporcionando uma fluidez dos lípidos da pele (PROW et al., 2011).

Em relação aos resultados de retenção de pele, foi encontrada uma maior quantidade de H3TM04 na epiderme ($3,08 \pm 0,67 \mu\text{g/cm}^2$) em relação à derme ($1,60 \pm 0,32 \mu\text{g/cm}^2$) quando se utilizam as nanopartículas CHQ-SDS-H como carreador da pirazolina. Esses resultados podem estar relacionados à hidrofobicidade do composto ativo, levando a uma maior afinidade pela epiderme, que é a camada mais lipofílica da pele (PATHAK; THASSU, 2015; PROW et al., 2011). Experimentos de microscopia de fluorescência confirmaram os resultados analíticos. As imagens mostraram uma maior distribuição de fluorescência através da pele tratada com Nps (Figura 51b). Além disso, a pele não tratada e a pele tratada com H3TM04 em solução de propilenoglicol mostraram uma intensidade de fluorescência semelhante à pele (não foi detectado o composto). A intensidade de fluorescência das amostras de pele tratadas com Nps e Nfs foi superior à da pele tratada com H3TM04 livre, particularmente na camada mais externa da pele (estrato córneo) (PROW et al., 2011).

Os perfis de permeação cutânea das Nfs estão de acordo com os estudos de liberação (Figura 50). A liberação do H3TM04 foi mais lenta para as Nfs contendo Nps (PEOChNp) do que para as Nfs contendo H3TM04 livre (PEOCh-H3). Como discutido acima, tanto a difusão como

Figura 51. a) Retenção de H3TM04 em pele humana, liberado das nanopartículas de CHQ-SDS-H depois de 7 h de ensaio de permeação. Indicando a diferença estatística ($p < 0,05$). b) imagens de microscopia de fluorescência de H3TM04 em pele humana (20 μm) depois de 7 h de tratamento; i) controle, ii) H3TM04, iii) Nps CHQ-SDS-H, iv) PEOChH3 e v) PEOChNps.



CAPÍTULO V

5 CONCLUSÕES GERAIS

No capítulo 2, foi descrita uma forma promissora de produzir nanoagregados de CHQ-SDS estáveis em solução aquosa. Agregados de CHQ apresentaram uma ampla distribuição de tamanho, sendo instáveis em tampão pH 7,4. Onde o R_H^{agg} aumenta com a concentração de CHQ, devido a processos de auto-organização das cadeias anfifílicas do biopolímero. A adição de SDS aumentou a estabilidade cinética e estreitou a distribuição de tamanho, dando à formação de nanoagregados de CHQ-SDS. O processo de associação é termodinamicamente espontâneo, com uma variação da entalpia negativa associada à formação dos agregados. Indicando, que a formação do complexo polímero-surfactante se deve à interação hidrofóbica cooperativa entre o SDS e os grupos hidrofóbicos da CHQ. Assim, o método descrito é viável para obtenção de nanoagregados de CHQ-SDS cineticamente estáveis em solução aquosa.

Aproveitando o conhecimento físico-químico da interação e formação dos nanoagregados de CHQ e SDS, Nps com morfologia esférica foram formadas e caracterizadas (CHQ-SDS) e aplicadas na encapsulação da pirazolina H3TM04. O SDS aumentou os domínios hidrofóbicos dentro das Nps promovendo uma alta capacidade de encapsulação do H3TM04 (96,8%). As Nps CHQ-SDS-H forneceram uma liberação controlada do H3TM04 através de um mecanismo controlado por erosão. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que os agregados de CHQ e as Nps de CHQ-SDS são biocompatíveis e não-tóxicas. Além disso, o encapsulamento de H3TM04 nas Nps de CHQ-SDS diminuiu o IC_{50} para células de leucemia Jurkat e K-562 após 24 e 72 h de incubação, respectivamente. Estes resultados demonstram que as Nps de CHQ-SDS são um sistema promissor para a liberação de fármacos derivados da pirazolina e/ou compostos hidrofóbicos.

As Nps de CHQ-SDS-H foram dispersas em Nfs de PEO-quitosana para obter um novo nanomaterial de liberação controlada de fármacos por dupla barreira polimérica. Este foi formado pela eletrofiação da blenda polimérica, sendo um método simples e de baixo custo. Nps intactas contendo H3TM04 foram incorporadas com sucesso nas Nfs de PEOCh sem evidência de aglomeração do particulado. As Nps incrementaram o diâmetro médio da Nfs ($197,8 \pm 4,1$ nm) e a hidrofobicidade da superfície das Nfs. A liberação *in vitro* do H3TM04 pela dupla barreira mostrou uma liberação inicial (*burst*) seguida de uma liberação lenta, sustentada e contínua até 120 h. As Nps diminuíram os valores de IC_{50} em aproximadamente

50% quando comparadas com o H3TM04 livre frente a células de melanoma. Em estudos de permeação cutânea *ex vivo*, o H3TM04 livre não foi detectado no fluido receptor ou nas camadas da pele. No entanto, quando o composto foi encapsulado nas Nps, foi encontrado nas camadas da epiderme ($3,08 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e da derme ($1,60 \pm 0,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Análises por microscopia de fluorescência demonstraram que as Nfs PEOChNp têm a capacidade de entregar o H3TM04 na pele humana, acumulando-se principalmente no estrato córneo (epiderme). Em resumo, este estudo indicou um método para assegurar a entrega controlada e sustentada de H3TM04, com potencial de aplicação do PEOChNp na quimioterapia local.

Por último, acreditamos que os resultados obtidos nesta pesquisa servirão como base e incentivo de um novo campo de pesquisa, como é a formação e aplicação de nanomateriais de dupla barreiras poliméricas para a liberação controlada de compostos ativos. A combinação de inúmeros agregados poliméricos daria a formação de novos nanomateriais a serem testados, e com novas características físico-químicas a serem avaliadas. Além disso, estes nanomateriais podem ser aplicados em inúmeras áreas de pesquisa, na qual seja necessário um processo de liberação controlado, sendo este o principal motivo para desenvolver este campo de trabalho.

6 REFERÊNCIAS

ALTEI, W. F. Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos. **Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013, 2014.**

ALVES, N. M.; MANO, J. F. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. v. 43, p. 401–414, 2008.

AMOOZGAR, Z. et al. Low molecular-weight chitosan as a pH-sensitive stealth coating for tumor-specific drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 1262–1270, 2012.

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1364–1370, 2010.

BHARMORIA, P. et al. Biamphiphilic ionic liquid induced folding alterations in the structure of bovine serum albumin in aqueous medium. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 1, p. 115–124, 2014.

CALEJO, M. T. et al. *in vitro* cytotoxicity of a thermoresponsive gel system combining ethyl(hydroxyethyl) cellulose and lysine-based surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 682–686, 2013.

CHEN, C. et al. Poly(lactic acid) (PLA) based nanocomposites—a novel way of drug-releasing. **Biomedical Materials**, v. 2, n. 4, p. L1–L4, 2007.

CHEN, C. K.; HUANG, S. C. Preparation of Reductant-Responsive N-Maleoyl-Functional Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Nanofibers for Drug Delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 4152–4167, 2016.

CHEN, G. et al. **Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy** *Chemical Reviews*, 2016.

CHEN, X. G.; PARK, H. J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355–359, 2003.

CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 2008.

DARBASIZADEH, B.; MOTASADIZADEH, H.; FOROUGHI-NIA, B. Tripolyphosphate-crosslinked chitosan/poly (ethylene oxide) electrospun nanofibrous mats as a floating gastro-retentive delivery system for ranitidine

hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 153, p. 63–75, 2018.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 153–160, 2010.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DE MODOLON, S. M. et al. Auto-associação do dodecilsulfato de sódio (SDS) com o polímero hidrofobicamente modificado etil(hidroxietil) celulose (EHEC). **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2046–2050, 2009.

DESBRIÈRES, J. et al. Surface activity of water soluble amphiphilic chitin derivatives. **Polymer Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 209–215, 1997.

DEVADASU, V. R.; BHARDWAJ, V.; KUMAR, M. N. V. R. Can Controversial Nanotechnology Promise Drug Delivery? **Chem. Rev.**, v. 113, p. 1696–1735, 2013.

DONG, L. et al. Cytotoxicity effects of different surfactant molecules conjugated to carbon nanotubes on human astrocytoma cells. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 12, p. 1517–1523, 2009.

DUNG, P. LE et al. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209–214, 1994.

FERREIRA, G. M. D. et al. Effect of 1-Butyl-3-methylimidazolium Halide on the Relative Stability between Sodium Dodecyl Sulfate Micelles and Sodium Dodecyl Sulfate-Poly(ethylene oxide) Nanoaggregates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 51, p. 15758–15768, 2015.

FERREIRA, G. M. D. **TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO DE LACTOFERRINA E POLI(ÓXIDO DE ETILENO) COM SURFACTANTES ANIÔNICOS**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.

FIGUEIREDO, P. et al. *in vitro* evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. **Biomaterials**, v. 121, p. 97–108, 2017.

FINKELSTEIN, Y. et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. **Clinical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 407–414, 2010.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1349–1362, 2017.

GHOSH, S. et al. Organic additive, 5-methylsalicylic acid induces spontaneous structural transformation of aqueous pluronic triblock copolymer solution: A spectroscopic investigation of interaction of curcumin with pluronic micellar and vesicular aggregates. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 39, p. 11437–11448, 2014.

HARDIANSYAH, A. et al. Novel pH-sensitive drug carriers of carboxymethyl-hexanoyl chitosan (Chitosonic® Acid) modified liposomes. **RSC Adv.**, v. 5, n. 30, p. 23134–23143, 2015.

HASSAN, P.; RANA, S.; VERMA, G. Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. **Langmuir**, v. 31, n. 1, p. 3–12, 2015.

HORCAS, I. et al. WSXM : A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology WSXM : A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Rev. Sci. Instrum.**, v. 78, n. 013705, 2007.

HSIAO, M. H. et al. Hexanoyl-chitosan-PEG copolymer coated iron oxide nanoparticles for hydrophobic drug delivery. **ACS Macro Letters**, v. 4, n. 4, p. 403–407, 2015.

IQBAL, B. et al. Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. **International journal of dermatology**, v. 57, p. 646–660, 2018.

JEE, J. P. et al. Cancer targeting strategies in nanomedicine: Design and application of chitosan nanoparticles. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 16, n. 6, p. 333–342, 2012.

JORDAN, A. et al. Anticancer Drugs : Agents Which Interact with the Mitotic Spindle. **Med Res Rev.**, v. 18, n. 4, p. 259–296, 1998.

JUNG, S. M. et al. Chitosan nanoparticle/PCL nanofiber composite for wound dressing and drug delivery. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 4, p. 252–263, 2015.

KABIRI, M.; UNSWORTH, L. D. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: Peptide self-assembly and protein adsorption case studies. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 10, p. 3463–3473, 2014.

KAMALY, N. et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

KENRY; LIM, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. **Progress in Polymer Science**, v. 70, p. 1–17, 2017.

KHAN, N. R. et al. Nanocarriers and their Actions to Improve Skin Permeability and Transdermal Drug Delivery. **Current pharmaceutical design**, v. 21, p. 2848–2866, 2015.

KIM, Y. J.; EBARA, M.; AOYAGI, T. A smart hyperthermia nanofiber with switchable drug release for inducing cancer apoptosis. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 46, p. 5753–5761, 2013.

KORCHAGINA, E. V.; PHILIPPOVA, O. E. Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3457–3466, 2010.

KORCHAGINA, E. V.; PHILIPPOVA, O. E. Effects of hydrophobic substituents and salt on core-shell aggregates of hydrophobically modified chitosan: Light scattering study. **Langmuir**, v. 28, n. 20, p. 7880–7888, 2012.

KORCHAGINA, E. V.; PHILIPPOVA, O. E. Ion-Specific Self-Assembly of Hydrophobically Modified Polycation of Natural Origin. **Macromolecules**, v. 48, n. 23, p. 8622–8628, 2015.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203–226, 2006.

LANGER, R. S. New Methods of Drug Delivery. **Science**, p. 1527–1533, 1990.

LI, C. W. et al. Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: A preclinical study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4131–4145, 2013.

LIN, Z. T. et al. Characterization of polymer micelles with hemocompatibility based on N-succinyl-chitosan grafting with long chain hydrophobic groups and loading aspirin. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 47, p. 19153–19165, 2011.

LIU, K. H. et al. Self-assembled hollow nanocapsule from amphiphatic carboxymethyl-hexanoyl chitosan as drug carrier. **Macromolecules**, v. 41, n. 17, p. 6511–6516, 2008.

LIU, S. et al. Inhibition of orthotopic secondary hepatic carcinoma in mice by doxorubicin-loaded electrospun polylactide nanofibers. **J. Mater. Chem. B**, v. 1, n. 1, p. 101–109, 2013.

LIU, T.-Y. et al. Synthesis and Characterization of Amphiphatic Carboxymethyl-hexanoyl Chitosan Hydrogel: Water-Retention Ability and Drug Encapsulation. **Langmuir**, v. 22, n. 23, p. 9740–9745, 2006.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

MAIORAL, M. F. et al. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 866–874, 2013.

MARTIN, C. et al. Controlled-release of opioids for improved pain management. **Materials Today**, v. 19, n. 9, p. 491–502, 2016.

MENG, J. et al. Tenofovir Containing Thiolated Chitosan Core/Shell Nanofibers: *in Vitro* and *in Vivo* Evaluations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 4129–4140, 2016.

MI, F. L.; WU, S. J.; CHEN, Y. C. Combination of carboxymethyl chitosan-coated magnetic nanoparticles and chitosan-citrate complex gel beads as a novel magnetic adsorbent. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 255–263, 2015.

MINATTI, E.; NORWOOD, D. P.; REED, W. F. Surfactant/polymer assemblies. 2. Polyelectrolyte properties. **Macromolecules**, v. 31, n. 9, p. 2966–2971, 1998.

MOLINA, M. et al. Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 17, p. 6161–6186, 2015.

MONDAL, R.; GHOSH, N.; MUKHERJEE, S. Enhanced Binding of Phenosafranin to Triblock Copolymer F127 Induced by Sodium Dodecyl Sulfate: A Mixed Micellar System as an Efficient Drug Delivery Vehicle. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 11, p. 2968–2976, 2016.

MOTIEI, M.; KASHANIAN, S. Novel amphiphilic chitosan nanocarriers for sustained oral delivery of hydrophobic drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 285–291, 2017.

MOURYA, V. .; INAMDAR, N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advance Materials Letters**, v. 1, n. May 2010, p. 10–33, 2014.

MU, Q. et al. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. **Chemical Reviews**, v. i, n. 15, p. 7740–7781, 2016.

MUHSIN, M. D. A. et al. Effects of Chemical Conjugation of L-Leucine to Chitosan on Dispersibility and Controlled Release of Drug from a Nanoparticulate Dry Powder Inhaler Formulation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 1455–1466, 2016.

MURTH, SUVAKANTA NARASIMHA, D.; NATH, L.; PRASANTA, C. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

NABEREZHNYKH, G. A. et al. Interaction of N-acylated and N-alkylated chitosans included in liposomes with lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 3, p. 301–308, 2013.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.

NORWOOD, D. P.; MINATTI, E.; REED, W. F. Surfactant/polymer assemblies. 1. Surfactant binding properties. **Macromolecules**, v. 31, n. 9, p. 2957–2965, 1998.

OLOFSSON, G.; LOH, W. On the use of Titration Calorimetry to Study the Association of Surfactants in Aqueous Solutions. **Journal of Brazil Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 577–593, 2009.

ONESIPPE, C.; LAGERGE, S. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and hydrophobically modified chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 648–658, 2008a.

ONESIPPE, C.; LAGERGE, S. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 317, n. 1–3, p. 100–108, 2008b.

ORLIKOVA, B. et al. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 125–147, 2011.

PAKRAVAN, M.; HEUZEY, M.; AJJI, A. Core – Shell Structured PEO-Chitosan Nanofibers by Coaxial Electrospinning. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 412–421, 2012.

PALMER, B. C.; DELOUISE, L. A. Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery systems for enhanced dose control and tissue targeting. **molecules**, v. 21, p. 2–17, 2016.

PANMAI, S. et al. Interactions between hydrophobically modified polymers and surfactants: A fluorescence

study. **Langmuir**, v. 18, n. 10, p. 3860–3864, 2002.

PARK, J. S. et al. N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 1, p. 37–45, 2006.

PATHAK, Y. VISHNUPANT; THASSU, D. **Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization**. [s.l.: s.n.]. v. 191

PAUL, B. K.; GUCHHAIT, N. Spectroscopic probing of location and dynamics of an environment-sensitive intramolecular charge transfer probe within liposome membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 2, p. 529–539, 2011.

PEREIRA, A. G. B.; MUNIZ, E. C.; HSIEH, Y. LO. ^1H NMR and ^1H - ^{13}C HSQC surface characterization of chitosan-chitin sheath-core nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 46–52, 2015.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

RAMASAMY, T. et al. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review. **Journal of Controlled Release**, v. 258, n. December 2016, p. 226–253, 2017.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1–2, p. 219–228, 2013.

RENGIFO, A. F. C. et al. Aggregation behavior of self-assembled nanoparticles made from carboxymethyl-hexanoyl chitosan and sodium dodecyl sulphate surfactant in water. **Journal of Molecular Liquids**, v. 278, p. 253–261, 2019.

SANPUI, P.; CHATTOPADHYAY, A.; GHOSH, S. S. Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 2, p. 218–228, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SHAABAN, M. R.; MAYHOUB, A. S.; FARAG, A. M. Recent advances in the therapeutic applications of pyrazolines. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 3, p. 253–291, 2012.

SHIN, S. Y. et al. Colorectal anticancer activities of polymethoxylated 3-naphthyl-5-phenylpyrazoline-carbothioamides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 17, p. 4301–4309, 2016.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 2013.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

STEFANES, N. M. et al. Synthesis of novel pyrazoline derivatives and the evaluation of death mechanisms involved in their antileukemic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 375–382, 2019.

STEWART, BERNARD W, WILD, C. P. International Agency for Research on cancer. World Health Organization. World cancer report 2014. World cancer Report 2014. **2014**, n. 1, p. 630, 2014.

SUFFREDINI, G.; EAST, J. E.; LEVY, L. M. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. **American Journal of Neuroradiology**, v. 35, n. 7, p. 1246--1253, 2013.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. Pinehurst, North Carolina, USA. Third: [s.n.].

THONGNGAM, M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of pH, ionic strength, and temperature on self-association and interactions of sodium dodecyl sulfate in the absence and presence of chitosan. **Langmuir**, v. 21, n. 1, p. 79–86, 2005.

TIĞLI AYDIN, R. S.; PULAT, M. 5-fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181–3198, 1999.

UNFRIED, K. et al. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2007.

UPADHYAYA, L. et al. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. **Journal of Controlled Release**, v. 186, p. 54–87, 2014.

VIJAY KUMAR THAKUR AND MANJU KUMAR THAKUR. Recent advance in graft copolymerization and application of chitosan: A review. **ACS Sustainable Chem. Eng**, v. 2, p. 2637–2652, 2014.

WANG, C. et al. Photocatalytic properties BiOCl and Bi₂O₃nanofibers prepared by electrospinning. **Scripta Materialia**, v. 59, n. 3, p. 332–335, 2008.

WANG, H. et al. Hyaluronic acid-decorated dual responsive nanoparticles of Pluronic F127, PLGA, and chitosan for targeted co-delivery of doxorubicin and irinotecan to eliminate cancer stem-like cells. **Biomaterials**, v. 72, p. 74–89, 2015.

WANG, Z. et al. Particle morphology: an important factor affecting drug delivery by nanocarriers into solid tumors. **Expert Opinion on Drug Delivery**, p. 1–17, 2017.

WONG, P. T.; CHOI, S. K. Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic Delivery Systems. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 9, p. 3388–3432, 2015.

XUE, J. et al. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 8, p. 1976–1987, 2017.

YI, H. et al. Biofabrication with chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 2881–2894, 2005.

YOO, H. S.; KIM, T. G.; PARK, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 12, p. 1033–1042, 2009.

YOON, O. J. Thermal characteristics of polyethylene oxide and functionalized bacterial cellulose whisker nanoparticle composite nanofibers. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 11, p. 973–979, 2016.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, 2015.

ZHANG, C. et al. Polymeric micelle systems of hydroxycamptothecin based on amphiphilic N-alkyl-N-trimethyl chitosan derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 2, p. 192–199, 2007.

ZHANG, E. et al. Comparison in docetaxel-loaded nanoparticles based on three different carboxymethyl chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 1012–1018, 2017.

ZHANG, Y. et al. Mechanical Force-Triggered Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 19, p. 12536–12563, 2016.

ZHAO, D. et al. Biochemical activities of N,O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 832–837, 2011.

ANEXO A

Procedimento da síntese de H3TM04

A pirazolina foi sintetizada a partir de 3,4,5-trimetoxifenil-calcona através de uma condensação aldólica de 3,4,5-trimetoxifenilfenona com naftaldeído à temperatura ambiente durante 24 h. Obteve-se a 3,4-trimetoxifenil-calcona por filtração no vácuo e recristalizou-se em acetato de etilo. A chalcona foi refluxada com hidrato de hidrazina e ácido acético por 6 h. A solução foi então neutralizada com solução de bicarbonato de sódio. O H3TM04 foi obtido por filtração no vácuo e recristalizado em acetato de etilo. A estrutura foi identificada com base no ponto de fusão, espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C , e análise elementar, a caracterização do composto foi reportado por Stefanos et al.

O H3TM04 apresentou um rendimento de 59% e um ponto de fusão na faixa de 169,3-171,6 °C.

ANEXO B

Figura S1. Efeito da concentração de CHQ sobre (a) Função de autocorrelação de DLS $g^{(1)}_{(q,t)}$ e (b) Distribuição de tempo de decaimento $A(\tau)$ no ângulo de espalhamento de $\theta = 90^\circ$ e 298,15 K.

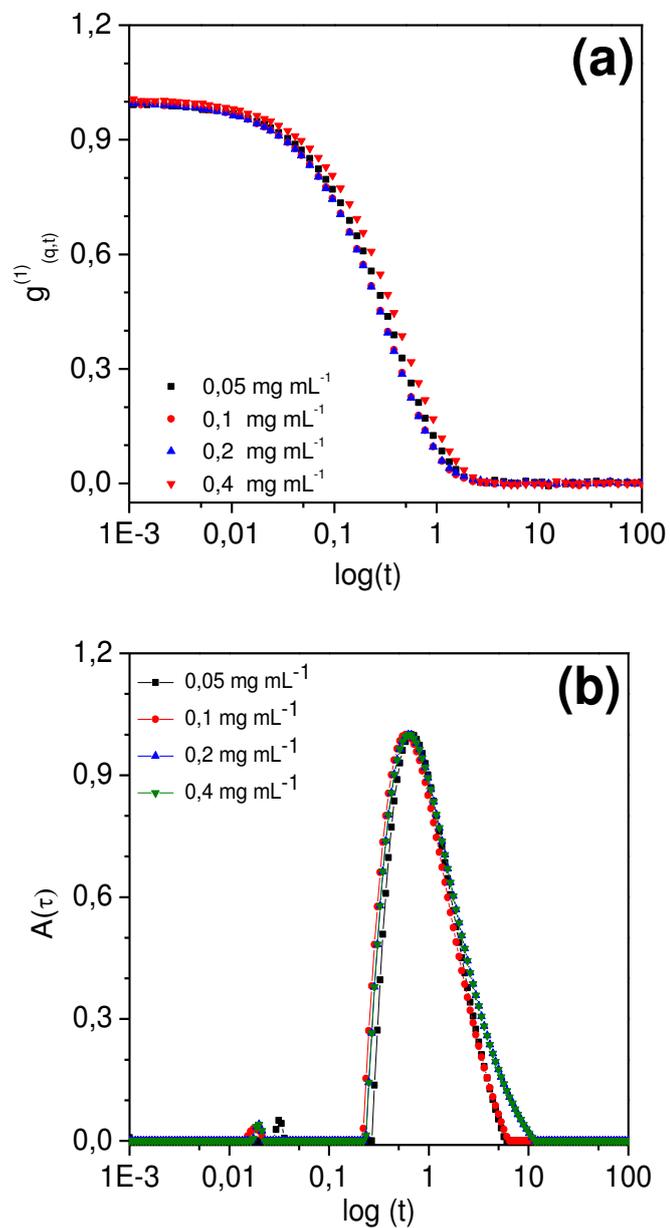


Figura S2. Dependência da taxa de relaxação Γ versus q^2 para o modo lento de diferentes concentrações de CHQ em solução aquosa (a) $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, b) $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, c) $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e d) $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, a diferentes ângulos de espalhamento (variando de 30° até 140°) e $298,15 \text{ K}$. As linhas vermelhas correspondem ao ajuste linear com coeficientes de correlação maior que $0,996$.

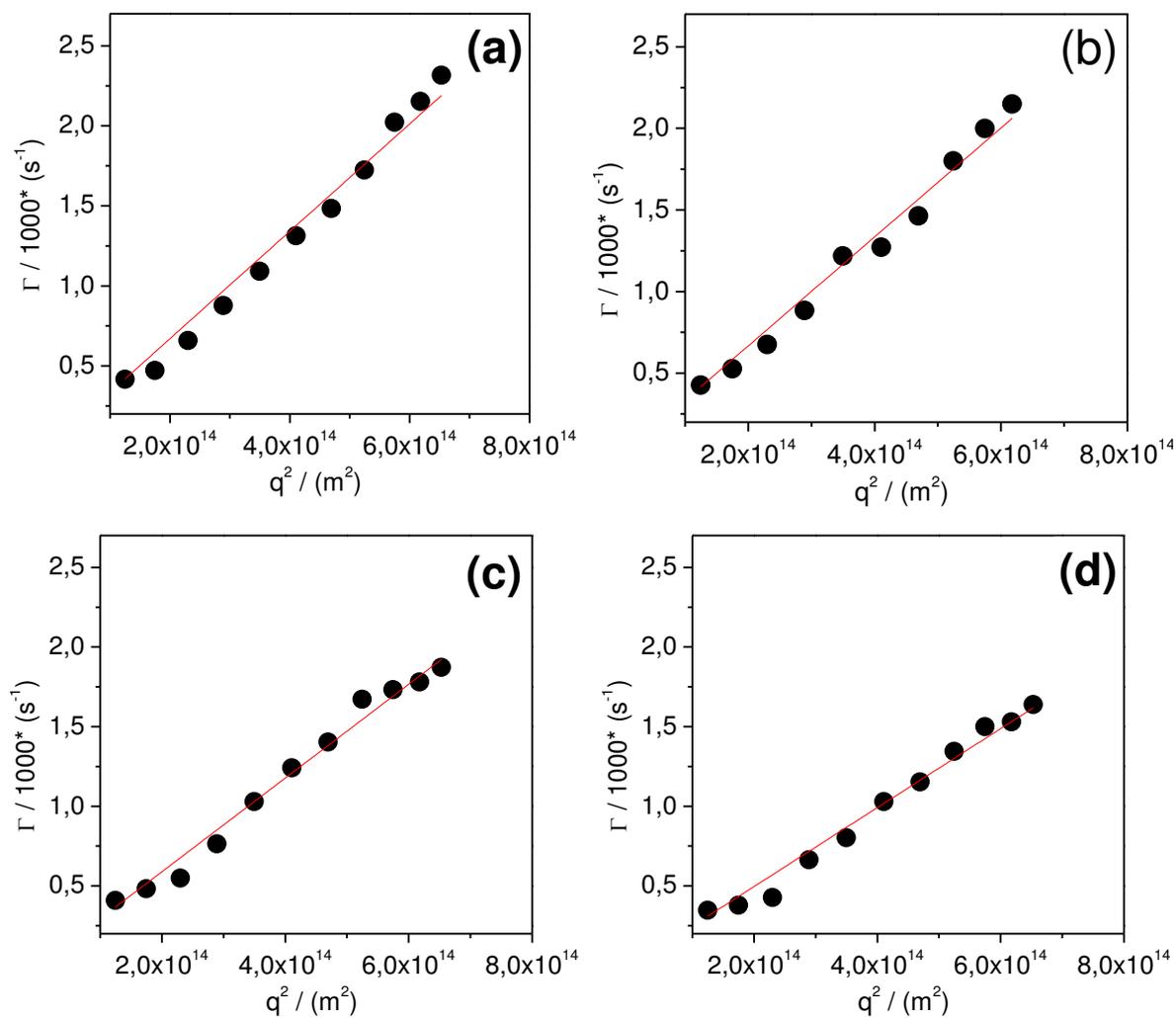


Figura S3. Variação do coeficiente de difusão real dos nanoagregados em função da concentração de CHQ ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ - $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) em solução aquosa a $298,15 \text{ K}$.

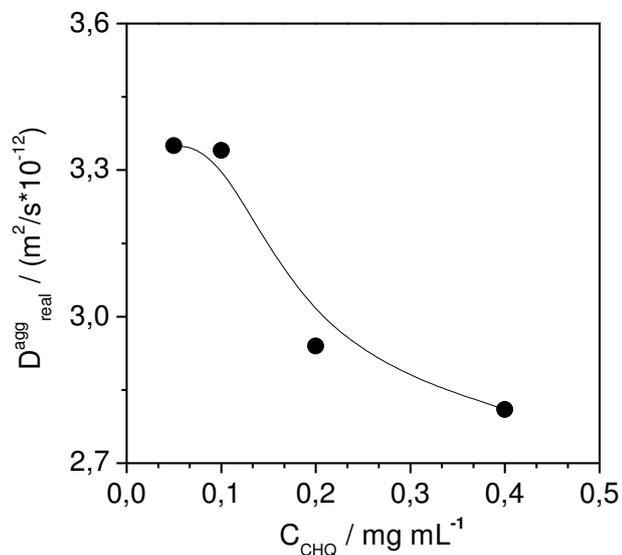


Figura S4. Distribuição de tamanho $A(R_H)$ de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ CHQ com (\circ) 0 h e (\bullet) 24 h de formação em solução aquosa no Angulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e $298,15 \text{ K}$. O gráfico interior apresenta a amplificação de 0 até 250 nm.

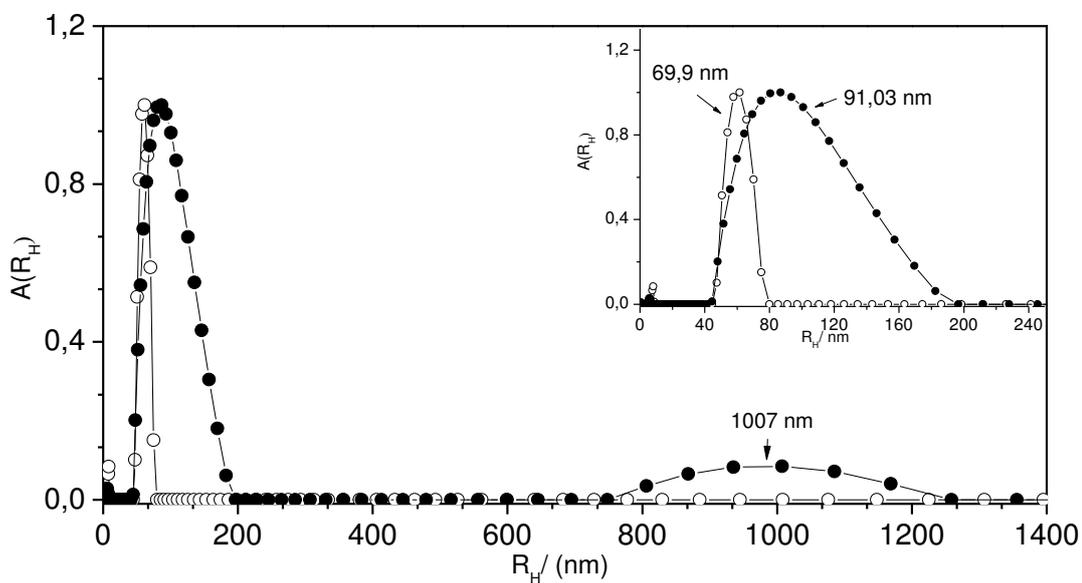


Figura S5. (a,b e c) Imagens de TEM de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ CHQ.

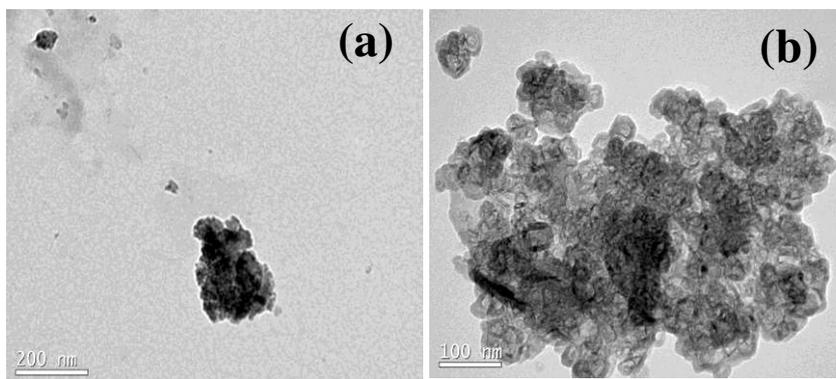


Figura S6. Potência em função do tempo para adições de ($10 \mu\text{L}$) de 19 mmol L^{-1} SDS em $2,7 \text{ mL}$ de a) tampão 7,4 e b) $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ CHQ em tampão 7,4 a $298,15 \text{ K}$.

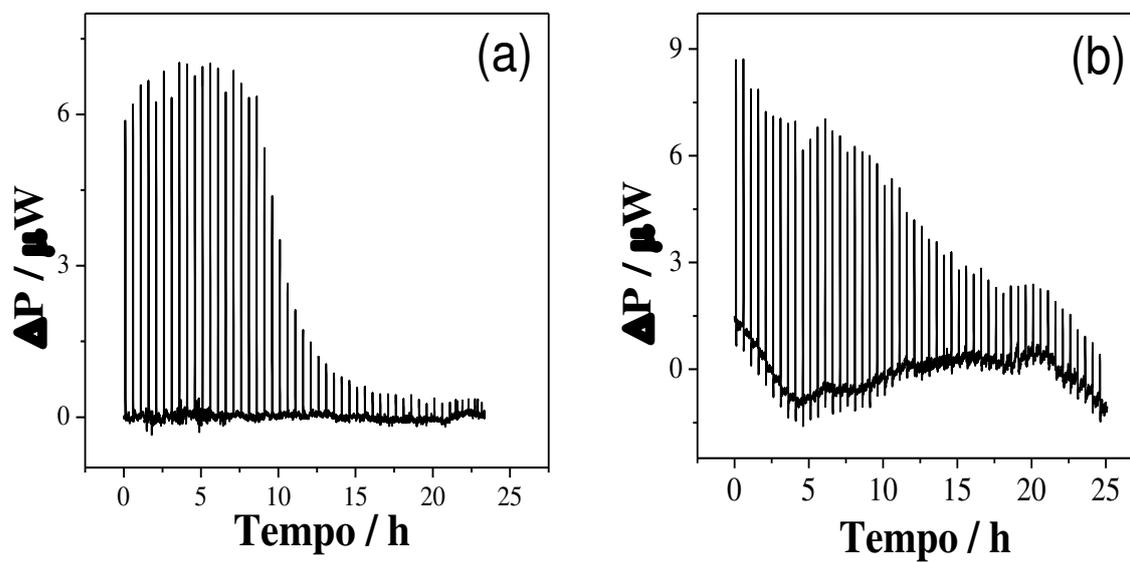
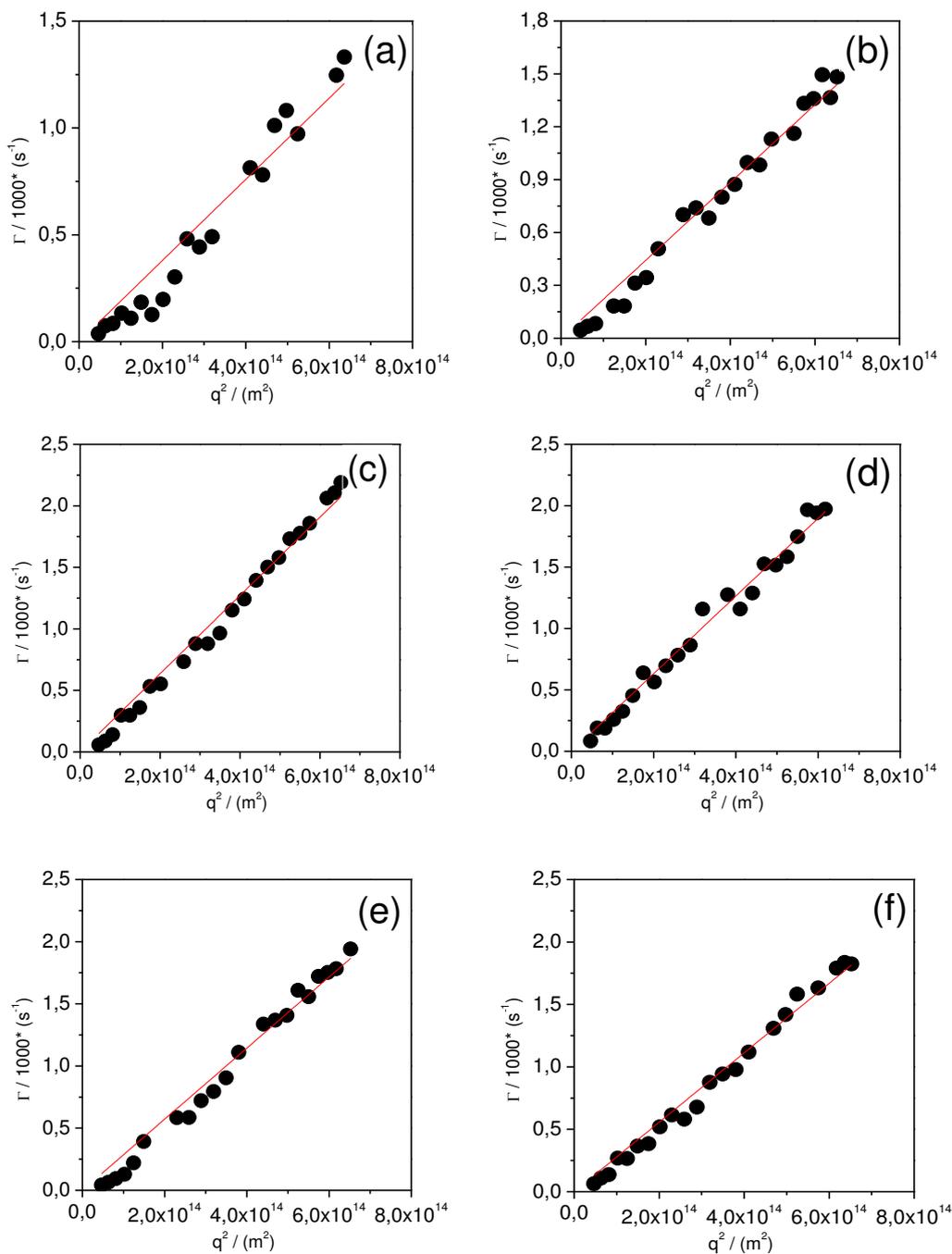


Figura S7. Dependência da taxa de relaxação Γ versus q^2 para o modo lento de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ CHQ com diferentes concentrações de SDS em solução aquosa (a) $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$, b) $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, c) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, d) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e) $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e f) $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$), a diferentes ângulos de espalhamento (variando de 30° até 140°) e $298,15 \text{ K}$. As linhas vermelhas correspondem ao ajuste linear com coeficientes de correlação maior que $0,996$, com exceção do sistema A ($R=0,987$).



ANEXO C

O grau de ionização do surfactante em no complexo SDS-CHQ (α_1) e nas micelas de SDS (α_2) são calculados usando as equações A.1 e A.2.

$$\alpha_1 = \frac{S_2}{S_1} \quad (\text{A.1})$$

$$\alpha_2 = \frac{S_3}{S_2} \quad (\text{A.2})$$

Onde S_1 , S_2 e S_3 são as inclinações das regiões de preagregação, premicelar e posmicellar no plote da condutividade em função da concentração de SDS.

A variação da energia livre de Gibbs de agregação do surfactante e o polímero (ΔG_{cac}^o), a variação da energia livre de Gibbs da saturação energética da interface com o surfactante (ΔG_{psp}^o) e a variação da energia livre de Gibbs da interação polímero-surfactante (ΔG_{ps}^o) são calculados utilizando as equações A.3, A.4 e A.5.

$$\Delta G_{cac}^o = (2 - \alpha_1)RT \ln C_{cac} \quad (\text{A.3})$$

$$\Delta G_{psp}^o = (2 - \alpha_2)RT \ln C_{psp} \quad (\text{A.4})$$

$$\Delta G_{psp}^o = (2 - \alpha_2)RT \ln C_{cmc} \quad (\text{A.5})$$

$$\Delta \Delta G_{agg}^o = \Delta G_{cac}^o - \Delta G_{cmc}^o \quad (\text{A.6})$$

Onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, α_1 é o grau de ionização do surfactante no complexo SDS-CHQ, α_2 é o grau de ionização do surfactante nas micelas de SDS, C_{cac} é a concentração crítica de agregação entre o SDS e CHQ e C_{psp} é a concentração crítica de agregação do SDS em presença de CHQ.

A variação da entalpia integral pela formação dos agregados pode ser calculada pela equação A.7

$$\Delta H_{agg} = \left[\frac{\sum q_{obs} - Y_{q_{demic+dil}}}{Y_{n^{inj}} - V_y \cdot (cmc)} \right] \quad (\text{A.7})$$

Onde Y é o número de injeções igual PSP (em cada injeção foi adicionado n^{inj} moles de surfactante) para obter um volume total V_Y . $\sum q_{\text{obs}}$ é a energia total medida e $Y_{q_{\text{demic+dil}}}$ é a energia de desmicelização y diluição.

ANEXO D

Figura S1. Imagens de FEG-SEM de nanofibras (a,d) PEOCh, (b,e) PEOCh-H3, (c, f) PEOChNp com x20.000 (a-c) e x100.000 (d-f) o tamanho original.

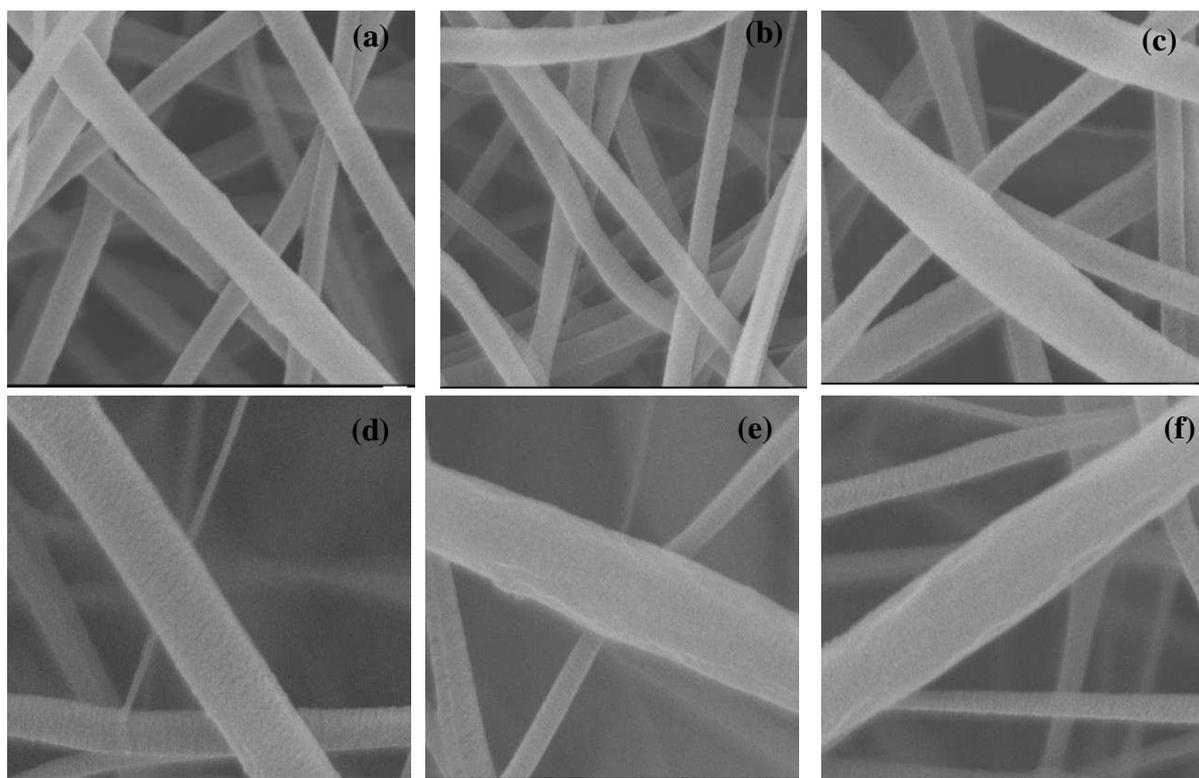


Figura S2. Imagens 3D de AFM das nanofibras formadas (a) PEOCh, (b) PEOCh-H3 and (c) PEOChNp.

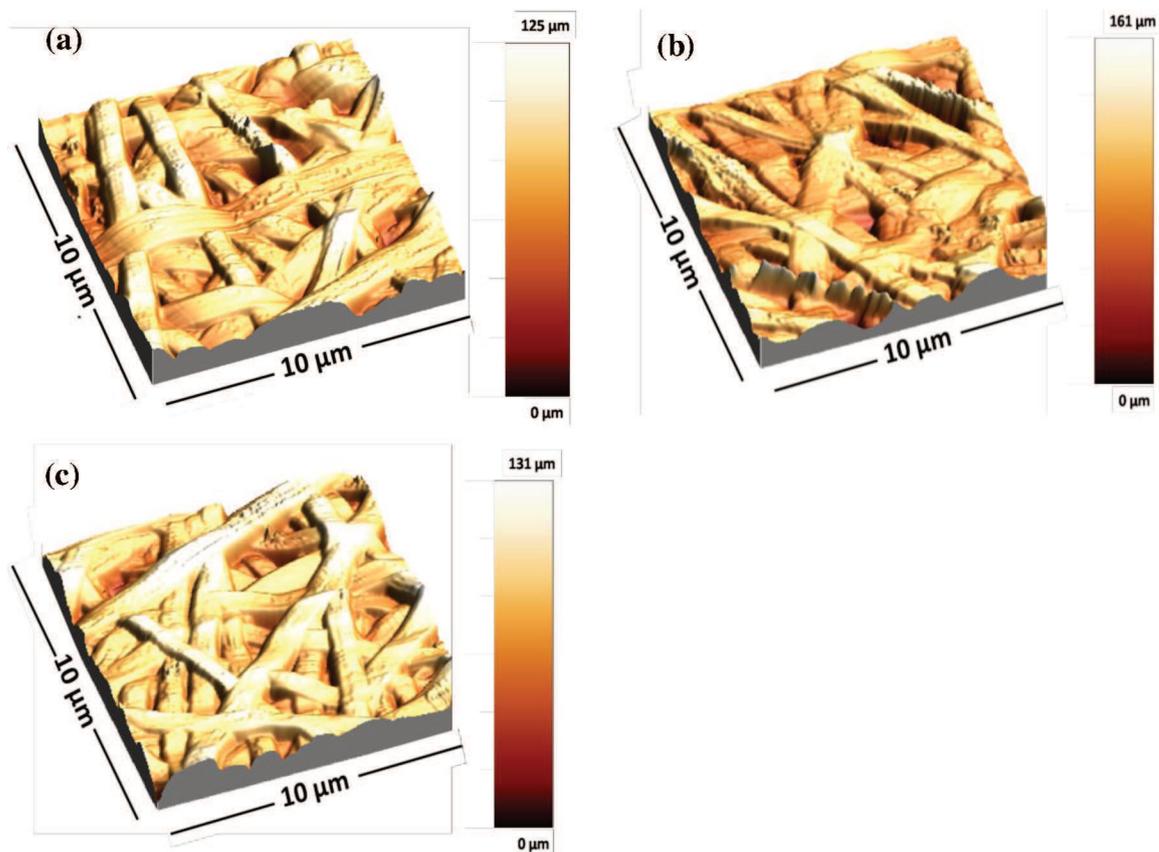


Figura S3. a) Perfil topográfico de AFM e b) Imagem de FEG-SEM x100.000 vezes o tamanho original das nanofibras de PEOChNp.

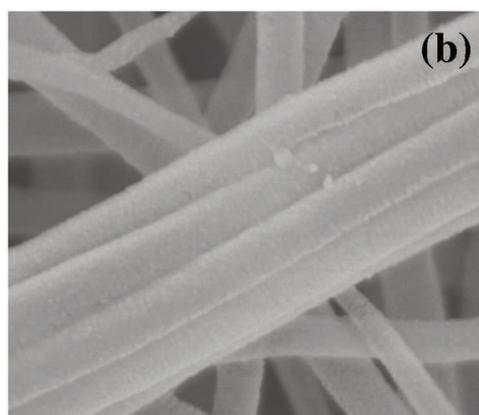
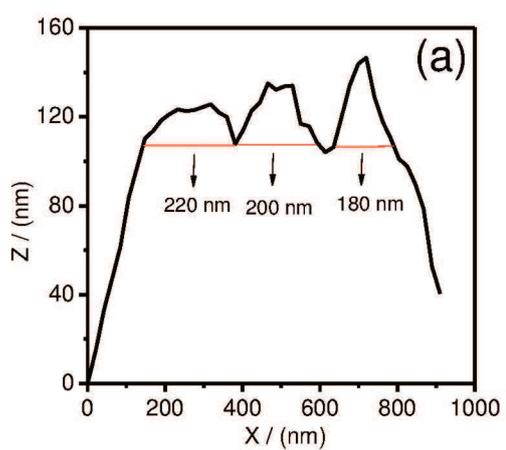


Figura S5. Imagens de TEM de nanofibras PEOChNp formadas com diferentes tempos de recoleção: (a) 2 h, (b) 4 h e (c) 8 h.

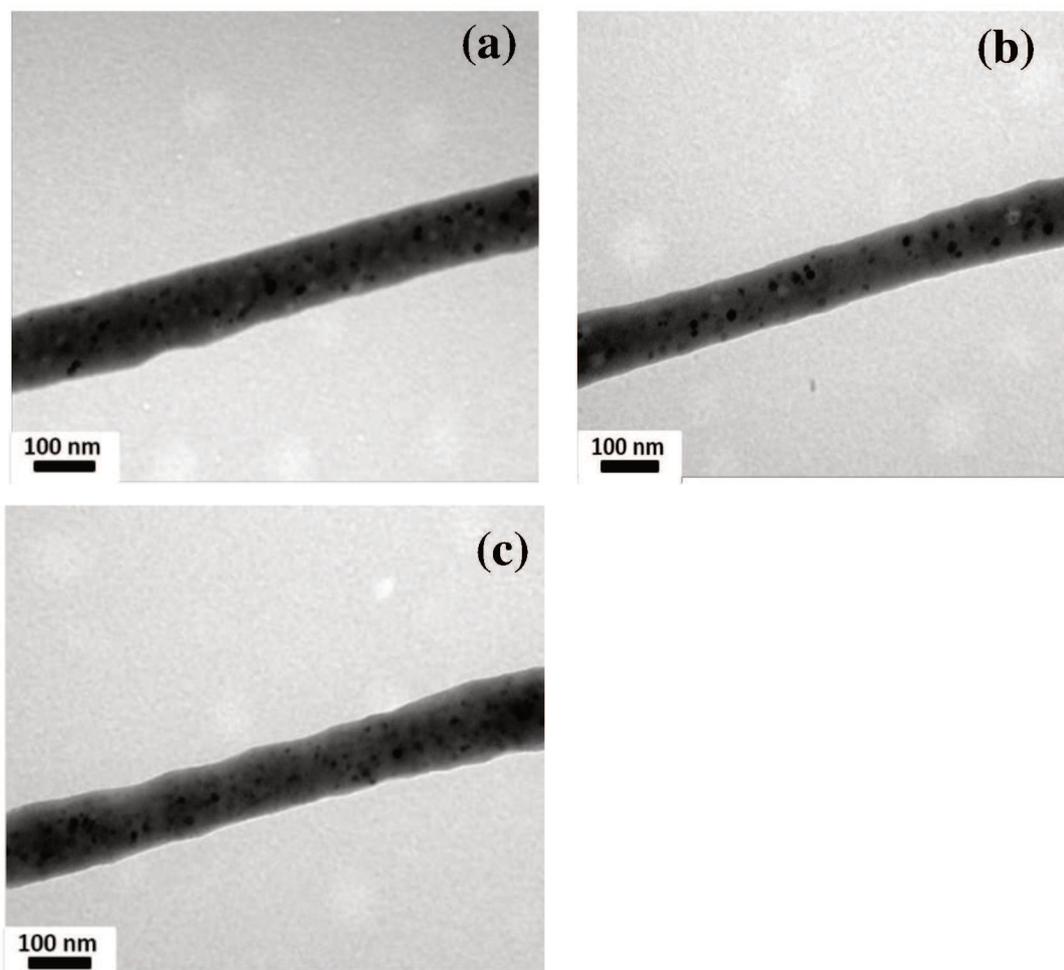


Figura S6. Cinética de liberação do H3TM04 de (a, b) ordem zero, (c, d) pseudo-primeiro orden (e,f) Higuchi e (g,h) lei de potência para as nanofibras (a, c, e, g) PEOCh-H3 e (b, d, f, h) PEOChNp.

