



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

Ana Carolina Domingues Fidalgo

**Material Polimérico Nanoestruturado para a liberação
pH-responsiva da curcumina**

Florianópolis
2022

Ana Carolina Domingues Fidalgo

Material Polimérico Nanoestruturado para a liberação pH-responsiva da curcumina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Química.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Passarella Gerola

Florianópolis

2022

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

Fidalgo, Ana Carolina Domingues

Material polimérico nanoestruturado para a liberação pH
responsiva da curcumina / Ana Carolina Domingues Fidalgo ;
orientadora, Adriana Passarella Gerola, 2022.

97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Sistemas de liberação sustentada. 3.
Curcumina. 4. Liberação pH-responsiva. 5. Nanomateriais. I.
Gerola, Adriana Passarella . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Ana Carolina Domingues Fidalgo

Material Polimérico Nanoestruturado para a liberação pH-responsiva da curcumina

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

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Thiago Caon
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.^a Dr.^a Camila Fabiano de Freitas Marin
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Dr.^a Adriana Passarella Gerola
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Dulce e Sérgio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dulce e Sérgio, por tudo o que fazem por mim e por sempre me apoiarem nas minhas decisões, sem a ajuda de vocês seria muito mais difícil chegar até aqui. Muito obrigada pelas palavras, ensinamentos, viagens e momentos que jamais serão esquecidos. Agradeço, também, à toda minha família, pelo suporte que sempre recebi de todos.

À Sara, minha namorada, que há alguns anos já me dá a oportunidade de compartilhar a vida com ela. Obrigada por ter aguentado esses anos de mestrado, pandemia e distância. Com certeza a vida é mais leve com você, a tua forma de ver a vida é inspiradora.

À professora Adriana, que aceitou me orientar sem nem mesmo me conhecer. Sou muito grata aos ensinamentos aprendidos, tanto os de química quanto os de vida. Obrigada pelo auxílio na realização deste trabalho e também pela confiança e amizade, sempre que precisar de uma companhia de trilha pode me chamar.

Aos meus amigos de infância, Lais, Juliana, Nathália, Sabrina e Lucas. Muito obrigada por serem minha segunda família, pelas tardes que passávamos em Guarapuava jogando beto-ombro e tomando tererê. Hoje o beto evoluiu para vídeo-game e o tererê para um copo de chopp. Obrigada por mesmo distantes estarem sempre presentes, pelas conversas, acampamentos, festas, vídeo-chamadas e grupos no Fortnite que a gente mais falava sobre a vida do que jogava. Sou muito grata por ter crescido com vocês.

Aos meus amigos que conheci durante a graduação na UFPR, Viktor, Carol, Letícia e Bianca. Já ouvi falar que as amizades feitas durante a faculdade duram pela vida inteira, e não tenho dúvidas disso. Muito obrigada por toda ajuda durante e após a graduação, pelos ótimos momentos que passamos juntos, os perrengues na faculdade, a formatura, as praias, e pela cumplicidade em compartilhar a vida e o amor pela química.

Aos meus amigos que foram verdadeiros presentes da ilha, Vinícius, Gabi e Débora. Obrigada por todos os momentos vividos em Florianópolis, tudo foi mais fácil e divertido com vocês. Até a beira-mar ou a Daniela com vento sul é mais agradável com vocês.

Aos professores membros da banca examinadora, obrigada por terem aceitado o convite.

À UFSC e a todos que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho.

E, por fim, ao CNPq pelo apoio financeiro.

“It is the experiences, the memories, the great triumphant joy of living to the fullest extent in which real meaning is found.”

(McCandless, 1992)

RESUMO

A curcumina é o principal agente ativo presente nos rizomas de açafrão-da-terra (*Curcuma longa*) e apresenta inúmeras propriedades terapêuticas, dentre elas anti-inflamatórias e anticancerígenas. No entanto, sua aplicação é limitada devido a sua baixa solubilidade em água. Dessa forma, são utilizados sistemas de liberação sustentada de fármacos para aumentar a sua solubilidade em meios aquosos e, conseqüentemente, aumentar a sua absorção pelo organismo e o seu tempo de circulação pela corrente sanguínea. Nesse trabalho, foram desenvolvidos dispositivos de liberação compostos pelo polímero comercial poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) (PMVE-AM) funcionalizado com grupos 1-(3-aminopropil)-imidazol (APIM) e surfactante catiônico cetiltrimetilamônio (CTAB) para o encapsulamento e a liberação pH-responsiva da curcumina. A curcumina foi caracterizada por espectrofotometria de absorção no UV-Vis e por espectroscopia de fluorescência em diferentes solventes. O coeficiente de absorvidade molar determinado para a curcumina solubilizada em etanol foi de $53,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O polímero funcionalizado (PMVEAIM) foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H , titulação potenciométrica e análise elementar (CHN). A auto-organização do polímero foi observada na presença do surfactante CTAB e o aparecimento de microambientes apolares foi analisada a partir de espectros de emissão de fluorescência utilizando o pireno como sonda fluorescente em função da concentração de CTAB. A formação dos agregados foi mais expressiva em pH 9 e 6 do que em pH 3, porém em todas as condições foi observado um valor de concentração agregacional crítica (cac) menor do que o valor de concentração micelar crítica (cmc) do CTAB. Os sistemas de liberação nanoestruturados baseados em complexos polímero/surfactante foram obtidos na ausência e na presença de curcumina. Os tamanhos médios e os potenciais zeta das nanopartículas foram medidos por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) em diferentes condições. Em pH 7, as partículas contendo curcumina apresentam tamanho médio entre 200 - 300 nm e -23,3 mV. A quantidade de curcumina encapsulada foi calculada através de espectros de absorção UV-Vis, pelo coeficiente de absorvidade molar obtido e a lei de Lambert-Beer. A concentração de curcumina nas partículas foi de $4,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As cinéticas de degradação da curcumina em suas formas livre e encapsulada foram realizadas, em pH 3, 7 e 9, por espectrofotometria de absorção no UV-Vis. Pelos espectros foi possível constatar que a curcumina apresenta baixa taxa de degradação quando encapsulada e, ainda, apresenta maior estabilidade em ambientes ácidos. Os ensaios de liberação da curcumina foram realizados em pH 3 e 7, mostrando uma liberação máxima de 27 % em pH 3 e de 70 % em pH 7, evidenciando um sistema de liberação pH-responsivo. Uma vez que a liberação mais eficiente ocorre em ambientes neutros, o dispositivo desenvolvido pode atuar em tratamentos de tumores na região do cólon.

Palavras-chave: curcumina, polímeros funcionalizados, nanomateriais, sistemas de liberação sustentada, materiais inteligentes.

ABSTRACT

Curcumin is the main active agent present in turmeric rhizomes (*Curcuma longa*) and has numerous therapeutic properties, among them anti-inflammatory and anticancer. However, its application is limited due to its low solubility in water. Thus, sustained drug delivery systems are used to increase its solubility in aqueous media and, consequently, increase its absorption by the body and its time of circulation through the bloodstream. In this work, release devices were composed by the commercial polymer poly(methyl vinyl ether -alt- maleic anhydride) (PMVE-AM) functionalized with groups 1-(3-aminopropyl)-imidazole (APIM) and cationic surfactante cetyltrimethylammonium (CTAB) for encapsulation and pH-responsive release of curcumin. Curcumin was characterized by UV-Vis absorption spectrophotometry and fluorescence spectroscopy in different solvents. The molar absorption coefficient determined for curcumin solubilized in ethanol was $53,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The functionalized polymer (PMVEAIM) was characterized by infrared spectroscopy, ^1H nuclear magnetic resonance, potentiometric titration and elemental analysis (CHN). The self-assembly of the polymer was observed in the presence of the CTAB and the appearance of apolar microdomains was analyzed from fluorescence spectra using pyrene as a fluorescent probe in the function of CTAB concentration. Aggregate formation was more expressive at pH 9 and 6 than at pH 3, however, in all conditions, it was observed a critical aggregation concentration (cac) value lower than the critical micelle concentration (cmc) value of CTAB. Nanostructured release systems based on polymer/surfactant complexes were obtained in the absence and presence of curcumin. The average sizes and zeta potentials of the nanoparticles were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) under different conditions. At pH 7, the particles containing curcumin present average size between 200 - 300 nm and zeta potential of -23.3 mV. The amount of encapsulated curcumin was calculated using UV-Vis absorption spectra, by the molar absorption coefficient obtained and Lambert-Beer law. The concentration of curcumin in the particles was $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. The kinetics of degradation of curcumin in its free and encapsulated forms were performed, at pH 3, 7 and 9, by absorption spectrophotometry in the UV-Vis. It was possible to observe by the spectra that curcumin presents low degradation rate when encapsulated and also presents greater stability in acidic environments. Curcumin release assays were performed at pH 3 and 7, showing a maximum release of 27% at pH 3 and 70 % at pH 7, evidencing a pH-responsive release system. Since the most efficient release occurs in neutral environments, the device developed can act in the treatment of tumors in the colon region.

Keywords: curcumin, functionalized polymers, nanomaterials, sustained release systems, smart materials.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química da curcumina e seus equivalentes tautoméricos. | 17 |
| Figura 2. Espectro de absorção da forma dicetona da curcumina em etanol absoluto (linha preta sólida) e em mistura etanol/água (linha preta tracejada); Espectros dos tautômeros da curcumina em água: forma enólica (em vermelho) e forma dicetona (em azul). | 17 |
| Figura 3. Espectros de absorção da curcumina em diferentes solventes. | 18 |
| Figura 4. Espécies desprotonadas da curcumina. | 19 |
| Figura 5. Produtos de degradação da curcumina em solução alcalina. | 19 |
| Figura 6. Variação dos níveis plasmáticos de fármacos quando administrados via (a) liberação convencional (em preto); (b) liberação sustentada (em azul). | 22 |
| Figura 7. Direcionamento passivo das nanopartículas para tecidos tumorais – Efeito EPR. | 24 |
| Figura 8. Representação dos mecanismos de liberação de fármaco em sistemas carreadores. | 25 |
| Figura 9. Estrutura química dos polímeros pH-responsivos citados. | 27 |
| Figura 10. Representação ilustrativa de uma liberação pH-responsiva. | 27 |
| Figura 11. Estrutura química do imidazol e suas estruturas de ressonância. | 28 |
| Figura 12. Estrutura do polímero poli[(benzil-L-aspartato)-co-(N-(3-aminopropil) imidazol-L-aspartamida)] poli(etileno glicol) e o mecanismo da liberação pH-responsiva em resposta à protonação do imidazol. | 29 |
| Figura 13. Funcionalização do monômero do poli(ácido hialurônico) com grupos 1-(3-aminopropil)-imidazol. | 29 |
| Figura 14. Representação simplificada de um monômero de surfactante. | 30 |
| Figura 15. Processo de micelização em função da concentração de surfactante em solução aquosa. | 32 |
| Figura 16. Representação esquemática da diminuição da tensão superficial em função da concentração de surfactante para uma solução de surfactante e uma mistura polímero – surfactante. | 33 |
| Figura 17. Modelo colar de pérolas que representa a interação polímero-surfactante. | 34 |
| Figura 18. Espectros de emissão de fluorescência do pireno em solventes apolar (hexano) e polar (DMSO). | 35 |
| Figura 19. Ataque nucleofílico de uma amina à um anidrido maleico, resultando na clivagem no anel e a formação de um grupo amida. | 36 |
| Figura 20. Funcionalização do (PMVE-AM) com (PAMAM). | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Espectros de absorção eletrônica da curcumina ($2,1 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em meio aquoso (pH 3, 6 e 9), DMSO e etanol..... | 46 |
| Figura 22. Espectro de absorção da curcumina em diferentes concentrações, em etanol. O inserte mostra a absorção da curcumina em 423 nm em função da concentração. | 47 |
| Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência da curcumina em diferentes solventes. [Cur] = 1×10^{-6} mol L ⁻¹ ; λ_{exc} = 400 nm; Emissão = 420 – 800 nm; fendas de emissão e excitação de 2,5 e 10 nm, respectivamente. | 48 |
| Figura 24. Diferença dos máximos de comprimentos de onda de absorção e emissão de fluorescência (deslocamento de Stokes) para a curcumina em DMSO..... | 49 |
| Figura 25. Espectros de infravermelho dos polímeros, a) PMVE-AM antes da funcionalização (em preto); e b) PMVEAIM após a funcionalização (em vermelho). | 51 |
| Figura 26. Espectro de RMN do polímero comercial PMVE-AM em acetona-D6. | 53 |
| Figura 27. Espectro de ¹ H RMN para o PMVEAIM em D ₂ O..... | 53 |
| Figura 28. Titulação potenciométrica do polímero PMVEAIM ($6,8 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) com o titulante KOH ($0,097$ mol L ⁻¹). | 55 |
| Figura 29. Distribuição (em %) das espécies de PMVEAIM em função do pH. | 56 |
| Figura 30. a) Espectros de emissão de fluorescência do pireno em função da concentração de PMVEAIM em água; b) Gráficos da razão das intensidades das bandas vibrônicas I e III (I_I/I_{III}) do espectro de fluorescência do pireno em função da concentração de PMVEAIM. | 57 |
| Figura 31. a) Espectros de emissão de fluorescência do pireno na presença de PMVEAIM ($9,3 \cdot 10^{-5}$ mol L ⁻¹) em função da concentração de CTAB em pH 9; b) I_I/I_{III} em função de [CTAB]; e c) I_{ex}/I_I em função de [CTAB]. | 59 |
| Figura 32. Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e razão I_{ex}/I_I das partículas em função da concentração de CTAB em pH 9. [PMVEAIM]= 1×10^{-4} mol L ⁻¹ | 62 |
| Figura 33. Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e razão I_{ex}/I_I das partículas em função da concentração de surfactante em pH 6. [PMVEAIM]= 1×10^{-4} mol L ⁻¹ | 63 |
| Figura 34. Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e razão I_{ex}/I_I das partículas em função da concentração de surfactante em pH 3. [PMVEAIM]= 1×10^{-4} mol L ⁻¹ | 64 |
| Figura 35. Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das partículas de polímero/surfactante em função: a) do tempo, em pH 3, a 25 °C; b) do tempo, em pH 7, a 25 °C; c) do pH do meio, a 25 °C; e d) da temperatura, em pH 7. ([PMVEAIM] = $4,4 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ; [CTAB] = $4,3 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹). | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 36. Espectro de absorção da curcumina ($1,36 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) incorporada no formulado utilizando etanol como solvente. | 66 |
| Figura 37. Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta dos formulados contendo curcumina em função: a) do tempo, em pH 3, a 25 °C; b) do tempo, em pH 7, a 25 °C; c) do pH do meio, a 25 °C; e d) da temperatura, em pH 7. ($[\text{PMVEAIM}] = 4,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CTAB}] = 4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CUR}] = 2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). | 67 |
| Figura 38. Espectros de absorção e cinéticas da degradação da curcumina em pH 3: a) curcumina livre; b) curcumina encapsulada. | 69 |
| Figura 39. Espectros de absorção da curcumina encapsulada em nanopartículas de PMVEAIM/CTAB em pH 3, nos tempos inicial e final..... | 69 |
| Figura 40. Espectros de absorção e cinéticas da degradação da curcumina em pH 7: a) curcumina livre; b) curcumina encapsulada. | 70 |
| Figura 41. Espectros de absorção e cinéticas de degradação da curcumina em pH 9: a) curcumina livre; b) curcumina encapsulada. | 71 |
| Figura 42. Espectros de absorção das nanopartículas e curva de variação das intensidades de absorção máxima em função do tempo: em pH 3 (a) e em pH 7 (b); e curvas da cinética de liberação da curcumina em função do tempo: em pH 3 (c) e em pH 7 (d)..... | 73 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Funcionalização do polímero comercial PMVE-AM com APIM, para a obtenção do PMVEAIM. | 50 |
| Esquema 2. Espécies de PMVEAIM em função do pH. | 56 |
| Esquema 3. Representação esquemática de complexos PMVEAIM/CTAB em diferentes pH. | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Dispositivos de liberação sustentada que se encontram em ensaio clínico. | 23 |
| Tabela 2. Classificação e exemplos de surfactantes. | 30 |
| Tabela 3. Valores de comprimento de onda de maior intensidade de absorção (λ_a^{\max}), emissão de fluorescência (λ_f^{\max}), deslocamento de estoque ($\Delta\lambda$) e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) para a curcumina em diferentes meios. | 50 |
| Tabela 4. Análise de CHN (em %) dos polímeros PMVEA e PMVEAIM. Os valores com asterisco foram calculados a partir da fórmula molecular dos monômeros. | 54 |
| Tabela 5. Valores das concentrações agregacionais críticas (cac) e de constantes de ligação (Kb) para PMVEAIM/CTAB em pH 3, 6 e 9. | 61 |
| Tabela 6. Constantes de velocidade de degradação da curcumina em diferentes pHs e variação da intensidade de absorção | 70 |
| Tabela 7. Valores das constantes de velocidade de liberação (k), tempo de meia-vida (t1/2) e porcentagem de liberação em pH 3 e pH 7. | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| Abs | Absorção |
| APIM | 1-(3-aminopropil)-imidazol |
| BIS-TRIS | 2-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol |
| CAC | Concentração agregacional crítica |
| CHN | Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio |
| CMC | Concentração micelar crítica |
| CTAB | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| CUR | Curcumina |
| DLS | Espalhamento dinâmico de luz |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DOX | Doxorrubicina |
| D ₂ O | Água deuterada |
| EPR | <i>Enhanced permeability and Retention</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| Gm | Gentamicina |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IR | Espectrofotometria de infravermelho |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| k _b | Constante de ligação |
| KOH | Hidróxido de potássio |
| nm | Nanômetros |
| mV | Milivolts |
| PAA | Poli(ácido acrílico) |
| PAMAN | Poli(amidoamina) |
| PAsp | Poli(ácido aspártico) |
| PDEAM | Poli(N,N-dietilacrilamida) |
| PDPAEMA | Poli(2-diisopropilaminoetil metacrilato) |
| PEG | Poli(etileno glicol) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |

| | |
|-----------------|---|
| pK_a | Constante de dissociação ácida em escala logarítmica |
| PLGA | Poli(ácido lático -co- ácido glicólico) |
| PMAA | Poli(ácido metacrílico) |
| PMVE | Poli(metil vinil éter) |
| PMVE-AM | Poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) |
| PMVEAIM | Poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) funcionalizado com imidazol |
| PNIPAM | Poli(N-isopropil acrilamida) |
| PNVCL | Poli(N-vinilcaprolactama) |
| ppm | Partes por milhão |
| PTX | Paclitaxel |
| Py | Pireno |
| RMN 1H | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| TRIS | Tris(hidroximetil)aminometano |
| UV-Vis | Espectrofotometria na região do Ultra-violeta e visível |
| λ | Comprimento de onda |
| λ_{Max} | Comprimento de onda de absorção máxima |
| ϵ | Coefficiente de absorvidade molar |
| δ | Deslocamento químico |
| μL | Microlitros |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 | CURCUMINA..... | 16 |
| 2.1.1 | Atividade biológica da curcumina em sistemas de liberação..... | 20 |
| 2.2 | LIBERAÇÃO SUSTENTADA | 21 |
| 2.3 | MATERIAIS INTELIGENTES | 25 |
| 2.4 | SURFACTANTES | 30 |
| 2.5 | INTERAÇÃO POLÍMERO – SURFACTANTE..... | 33 |
| 2.6 | POLI(METIL VINIL ÉTER -ALT- ANIDRIDO MALEICO) (PMVE-AM)..... | 35 |
| 3 | OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAIS | 39 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 39 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 4.1 | MATERIAIS..... | 40 |
| 4.2 | METODOLOGIA..... | 40 |
| 4.2.1 | Caracterização espectroscópica da curcumina | 40 |
| 4.2.1.1 | <i>Espectrofotometria de absorção eletrônica e de fluorescência da curcumina em meio homogêneo.....</i> | <i>40</i> |
| 4.2.2 | Funcionalização do polímero PMVE-AM | 41 |
| 4.2.3 | Caracterização do polímero funcionalizado (PMVEAIM) | 41 |
| 4.2.3.1 | <i>Espectroscopia de Infravermelho (IR).....</i> | <i>41</i> |
| 4.2.3.2 | <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H).....</i> | <i>42</i> |
| 4.2.3.3 | <i>Análise Elementar (CHN).....</i> | <i>42</i> |
| 4.2.3.4 | <i>Titulação Potenciométrica.....</i> | <i>42</i> |
| 4.2.4 | Estudo da auto-organização do PMVEAIM (com e sem surfactante)..... | 42 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.2.4.1 | <i>Avaliação da formação de microambientes através do pireno como sonda fluorescente de polaridade</i> | 42 |
| 4.2.4.2 | <i>Tamanho médio e potencial zeta dos agregados</i> | 43 |
| 4.2.5 | Preparação de sistemas de liberação nanoparticulados baseados em complexos polímero/surfactante na presença e na ausência de curcumina | 43 |
| 4.2.5.1 | <i>Determinação do tamanho hidrodinâmico e do potencial zeta dos sistemas de liberação nanoestruturados na ausência e presença de curcumina</i> | 43 |
| 4.2.5.2 | <i>Encapsulamento de curcumina</i> | 44 |
| 4.2.6 | Cinética de degradação da curcumina livre e encapsulada | 44 |
| 4.2.7 | Cinética de liberação | 44 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 45 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA CURCUMINA LIVRE | 45 |
| 5.1.1 | Caracterização Espectroscópica da curcumina | 45 |
| 5.2 | SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO | 50 |
| 5.2.1 | Análise elementar (CHN) | 54 |
| 5.2.2 | Titulação potenciométrica do polímero funcionalizado PMVEAIM | 54 |
| 5.3 | ESTUDO DA AUTO-ORGANIZAÇÃO DO PMVEAIM (SEM E COM SURFACTANTE)..... | 57 |
| 5.3.1 | Avaliação da formação de microambientes através do pireno como sonda fluorescente de polaridade | 57 |
| 5.3.2 | Complexos supramoleculares do polímero PMVEAIM e do surfactante cetiltrimetilamônio (CTAB) | 58 |
| 5.3.3 | Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das partículas de PMVEAIM/CTAB | 61 |
| 5.4 | OBTENÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOPARTÍCULADOS BASEADOS EM COMPLEXOS POLÍMERO/SURFACTANTE..... | 64 |
| 5.4.1 | Sistemas de liberação nanoestruturados na ausência de curcumina | 64 |
| 5.4.2 | Sistemas de liberação nanoestruturados após a incorporação de curcumina | 66 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.5 | ESTABILIDADE DA CURCUMINA LIVRE E ENCAPSULADA NOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO..... | 68 |
| 5.6 | CINÉTICAS DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DOS SISTEMAS CARREADORES..... | 71 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 75 |
| | REFERÊNCIAS..... | 77 |
| | APÊNDICE A | 88 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as doenças com maior *causa mortis* do mundo, com quase 10 milhões de óbitos em 2020.¹ É uma patologia capaz de surgir em qualquer tecido do corpo quando células mutadas geneticamente crescem de modo desordenado e que podem se espalhar rapidamente para outros órgãos.² Segundo dados publicados pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o triênio 2020-2022, estima-se mais de 1,8 milhões de novos casos no Brasil.³ Em razão do alto índice de novos casos, é compreensível o motivo dessa doença ser considerada um grande problema de saúde global. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado melhora a qualidade de vida do paciente e aumenta consideravelmente as chances de cura.

Ainda hoje, os principais tratamentos para tumores malignos são a quimioterapia e a radioterapia, métodos altamente invasivos, uma vez que apresentam baixa seletividade e especificidade entre células cancerosas e normais, atingindo também células de tecidos saudáveis.⁴ De forma a evitar os efeitos adversos provenientes desses tratamentos, pesquisadores têm mostrado cada vez mais interesse no estudo de produtos naturais, uma vez que apresentam grande potencial farmacológico, menor toxicidade em tecidos saudáveis e menor custo de obtenção.⁵ Sabe-se que uma grande variedade de plantas possui em sua composição agentes ativos que apresentam atividades anticancerígenas e quimioterápicas, contudo a aplicação ainda é bastante limitada devido principalmente à baixa solubilidade desses compostos em água, característica essa que afeta a biodisponibilidade no organismo, sendo rapidamente eliminados do corpo após a ingestão.⁶ No presente trabalho, a curcumina foi escolhida como modelo de estudo, em vista que essa molécula apresenta inúmeras atividades biológicas, sendo conhecida por possuir propriedades quimioterápicas e quimiopreventivas.⁷

O avanço da nanotecnologia nas áreas médicas e farmacêuticas tornou possível o entrelaçamento das inovações com a aplicação dos produtos naturais no tratamento de uma grande variedade de doenças. Tal avanço tornou possível o desenvolvimento de dispositivos de liberação sustentada, dentre eles, as nanopartículas poliméricas, objeto de estudo nesse trabalho, que são capazes de aumentar a solubilidade do composto encapsulado e, ainda, direcionar e controlar a sua liberação em locais específicos do corpo.⁸

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

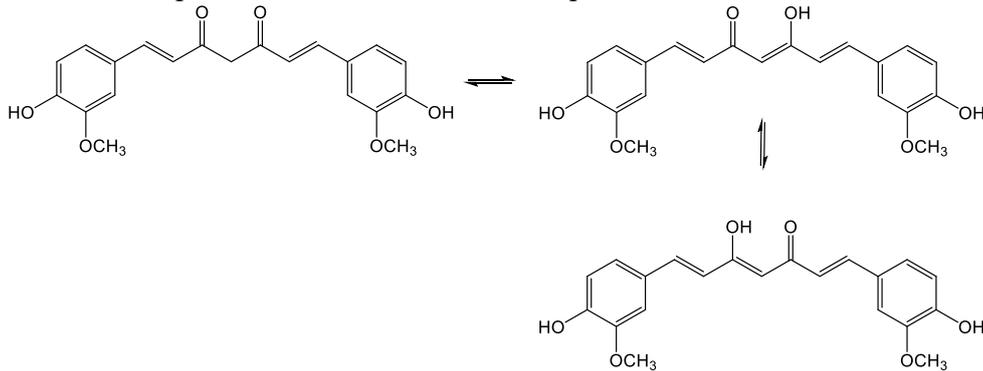
2.1 CURCUMINA

A curcumina é um agente ativo extraído do açafrão-da-terra, um tempero muito utilizado na gastronomia indiana. É uma substância conhecida por apresentar atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiangiogênica, anticancerígena, antidiabética, antiproliferativa, antifúngica, antibacteriana e ainda atua na desaceleração da degeneração proveniente da doença de Alzheimer.⁹⁻¹⁶

Foi descoberta em 1815, nos laboratórios da Universidade de Harvard, por Vogel e Pelletier, ao isolar um material amarelado dos rizomas de *Curcuma longa* e assim denominá-lo.¹⁷ Anos mais tarde, descobriu-se que o material isolado era, na verdade, uma mistura de óleo turmérico e resina. Em 1842, Vogel Jr. isolou a curcumina essencialmente pura, porém ainda sem uma definição exata de sua estrutura química.¹⁸ Apenas 68 anos depois, em 1910, Milobedzka e Lampe elucidaram a sua formulação estrutural.¹⁹ Apresentada como uma molécula bis- α,β -insaturada- β -dicetona e de nomenclatura IUPAC (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, a curcumina é um composto polifenólico simétrico, de massa molar 368,38 g.mol⁻¹, hidrofóbica em pH neutro (logP ~ 3)²⁰, parcialmente hidrofílica em pH básico e facilmente solúvel em DMSO, metanol, etanol, acetona, acetonitrila, clorofórmio, entre outros.²¹⁻²³ Rahman *et al.* determinaram valores de solubilidade para a curcumina em soluções aquosas com diferentes pH, de modo a confirmar a sua baixa solubilidade em água, os valores obtidos foram 231±5,5 µg/mL para pH 4, 348±3,2 µg/mL para pH 7,4 e 482±5,7 µg/mL para pH 8.²⁴

Conhecida, também, por sua instabilidade, a curcumina apresenta três grupos funcionais reativos: um dicetona e dois o-metóxi-fenólicos. A dicetona sofre tautomerização espontaneamente, de forma que, dependendo das condições do ambiente em que a molécula está inserida, três estruturas químicas são possíveis: o tautômero dicetona e os dois equivalentes tautoméricos ceto-enol, como apresentado na **Figura 1**. Em solventes apolares a curcumina se apresenta preferencialmente na forma ceto (pH 3 – 9), enquanto em solventes polares, principalmente apróticos, se apresenta na forma enólica. Os solventes polares próticos são passíveis de interagir com o hidrogênio do enol, de forma a romper a ligação de hidrogênio intramolecular, resultando na conversão da forma enólica para a forma ceto.²³

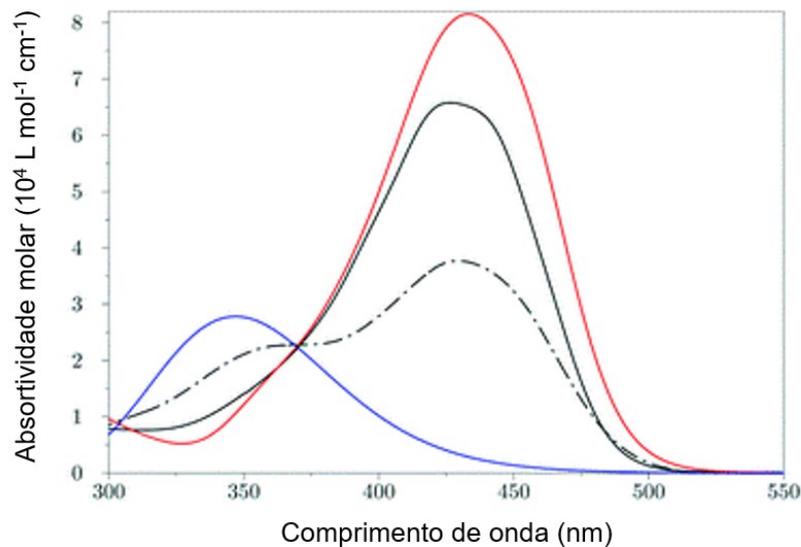
Figura 1. Estrutura química da curcumina e seus equivalentes tautoméricos.



Fonte²³

A forma enol da curcumina é mais estável energeticamente do que a diceto, em razão da presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e da planaridade da forma enólica, que permite uma melhor sobreposição de elétrons π , melhorando, portanto, a conjugação dos elétrons.^{25,26} Assim, a máxima absorção da forma enol em comprimento de onda entre 420 – 440 nm é resultante das transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ do sistema altamente conjugado da estrutura química da curcumina.^{23,27,28} Para a forma diceto o máximo de absorção desloca-se para o azul em comparação à forma enol (**Figura 2**), isso porque, a estrutura da dicetona é torcida e a conjugação é diminuída.²⁹

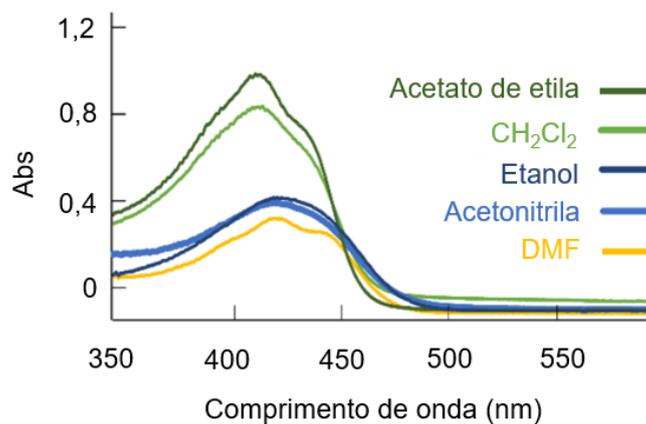
Figura 2. Espectro de absorção da forma dicetona da curcumina em etanol absoluto (linha preta sólida) e em mistura etanol/água (linha preta tracejada); Espectros dos tautômeros da curcumina em água: forma enólica (em vermelho) e forma dicetona (em azul).



Adaptado de³⁰

A curcumina também apresenta propriedades solvatocrômicas, ou seja, solventes de diferentes polaridades podem causar variações no comprimento de onda máximo (λ_{max}), na intensidade e no formato da banda de absorção (**Figura 3**).^{26,31} Essas variações são decorrentes das interações intermoleculares entre o soluto e o solvente, que provocam alterações energéticas entre os estados fundamental e excitado do soluto.³² Em solventes polares como metanol, etanol e DMSO, o espectro de absorção é alargado e apresenta menor resolução vibracional, enquanto em solventes apolares como benzeno, tolueno e tetracloreto de carbono, os espectros apresentam bandas mais estruturadas, que resultam em maior resolução vibracional. Normalmente, o máximo de absorção da curcumina apresenta um deslocamento para maiores comprimentos de onda em solventes capazes de fazer ligação hidrogênio, enquanto em solventes apolares a forma diceto, menos polar, pode prevalecer.²³

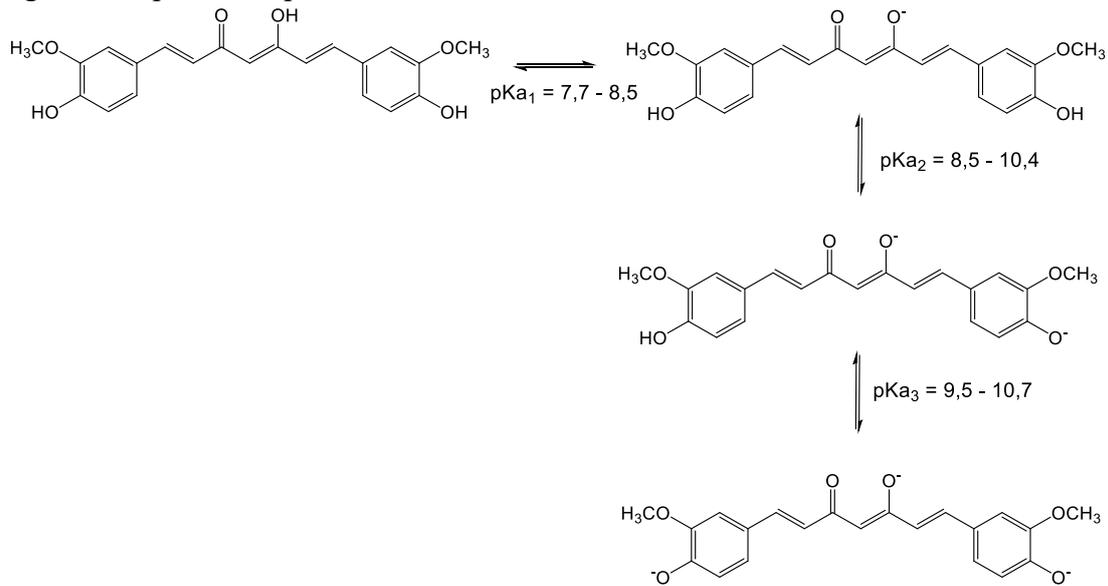
Figura 3. Espectros de absorção da curcumina em diferentes solventes.



Fonte ³³

Além da polaridade, o pH da solução também influencia na estrutura, na estabilidade e no comportamento espectrofotométrico da curcumina. Por exemplo, em ácido o máximo de absorção é a 422 nm e em meio aquoso básico a absorção máxima muda para maiores comprimentos de onda (460 nm) devido à ionização do grupo OH fenólico e formação do íon fenóxido (**Figura 4**).^{23,34}

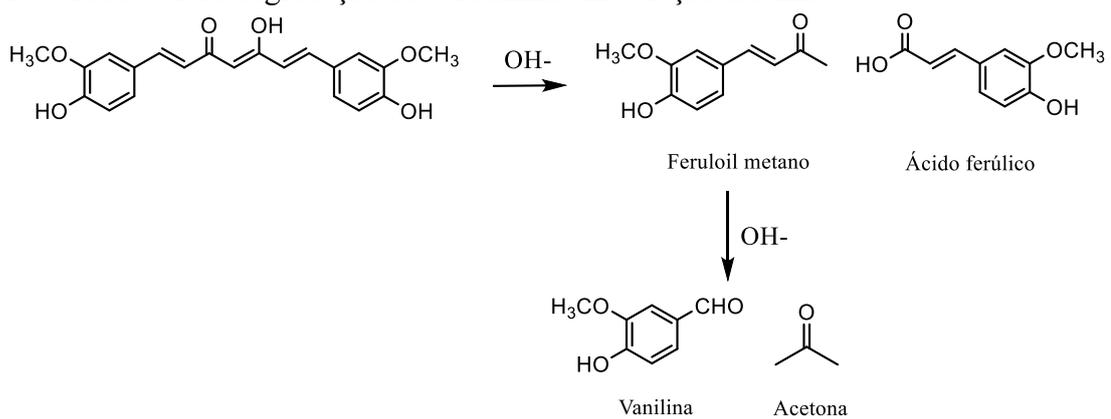
Figura 4. Espécies desprotonadas da curcumina.



Fonte²³

A curcumina é uma molécula hidrofóbica e insolúvel em água, contudo em ambiente alcalino, tem-se a desprotonação das hidroxilas pertencentes à sua estrutura química e, em razão disso, ocorre o aumento da solubilidade em meio aquoso.³⁵ Além de alterar a solubilidade em meio aquoso, a ionização da curcumina aumenta a degradação da mesma. Em condições básicas a curcumina sofre hidrólise pelos íons OH^- em solução, formando produtos de degradação em maior quantidade, conforme apresentado na **Figura 5**.³⁶

Figura 5. Produtos de degradação da curcumina em solução alcalina.



Fonte³⁶

2.1.1 Atividade biológica da curcumina em sistemas de liberação

A curcumina tem apresentado resultados promissores na prevenção e no tratamento de variados tipos de câncer, sendo uma molécula que intervém nos estágios iniciais de crescimento excessivo de células cancerosas (principalmente câncer de mama, cólon, oral, duodeno, estômago e epitelial), agindo como um quimiopreventivo. Já como um quimioterápico, a curcumina apresenta atividade antiangiogênica – angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasculatura já existente³⁷ – sendo essa uma propriedade importante para evitar o crescimento, a sobrevivência e o espalhamento (metástase) de células cancerígenas.³⁸ Além disso, estudos comprovam que o seu uso causa menos efeitos colaterais do que os fármacos quimioterapêuticos utilizados hoje em dia. Apesar de seu elevado potencial terapêutico, sua aplicação na indústria farmacêutica ainda é limitada devido à sua baixa biodisponibilidade.³⁹ O primeiro estudo sobre a distribuição e a absorção da curcumina foi publicado em 1980, utilizando-se camundongos como modelo *in vivo*. Foram administrados 400 mg via oral e observado que 60% do total foi absorvido, porém sua presença não foi detectada em urina e sangue arterial, sendo percebido apenas rastros em sangue do sistema portal (< 5 µg/tecido). Após 24 horas, constatou-se que 38% da curcumina ingerida acumulou-se no intestino grosso.⁴⁰

A baixa biodisponibilidade da curcumina é consequência, principalmente, da sua baixa absorção e solubilidade em água.³⁹ Diversos estudos já reportaram que o encapsulamento da curcumina em sistemas de liberação sustentada aumenta a sua solubilidade em água e a sua estabilidade, de forma a ampliar o tempo de circulação no sangue e o acúmulo em locais específicos do corpo.^{41,42}

Shaikh *et al.* (2009) relataram a encapsulação da curcumina em nanopartículas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). A eficiência de incorporação da curcumina foi de 77% e a liberação foi de 24% do conteúdo encapsulado nas primeiras 24 horas e manteve-se uma liberação sustentada de 20% por 20 dias. Foram realizados estudos *in vivo* aplicando as nanopartículas em camundongos e foi possível observar que a biodisponibilidade de curcumina foi cerca de 9 vezes maior em comparação com a administração em sua forma livre.⁴³

Dende *et al.* (2017) também desenvolveram um dispositivo de liberação sustentada utilizando o polímero PLGA, com o intuito de se conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e liberar a curcumina no cérebro para o tratamento de malária cerebral. Os resultados mostraram, pela primeira vez, o potencial da curcumina encapsulada em

nanopartículas para o tratamento dessa doença. A liberação ocorreu de forma sustentada por mais de 12 horas, mantendo a concentração de 5ng/g de curcumina no cérebro.⁴⁴

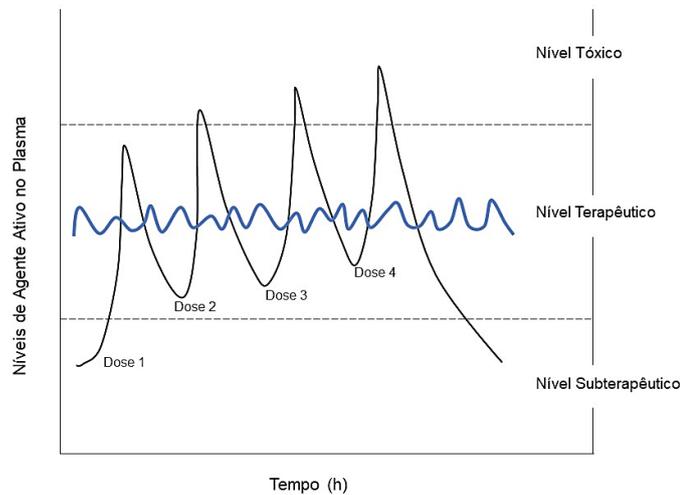
Xu *et al.* (2020) encapsularam a curcumina em dispositivos pH-responsivos de amido oxidado funcionalizados com imidazol. Os resultados mostraram que a incorporação ocorreu em níveis satisfatórios e a liberação se deu mais rapidamente em pH 5.5 do que em pH 7.4, indicando que uma liberação mais eficaz ocorre numa faixa de pH entre 5.0 e 6.0. Ainda, após estudos *in vitro*, foi possível observar uma maior concentração de curcumina em células cancerosas.⁴⁵

Os artigos mencionados, e os inúmeros já publicados⁴⁶⁻⁵³, mostram a possibilidade de se encapsular a curcumina em nanopartículas poliméricas e o grande aumento no potencial terapêutico que esses dispositivos implicam, tanto para a curcumina quanto para outros fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade. Portanto, torna-se compreensível a importância de se prosseguir com os estudos e o desenvolvimento de novos materiais para a liberação sustentada de fármacos.

2.2 LIBERAÇÃO SUSTENTADA

O desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada teve início na década de 60⁵⁴ com o intuito de suprir as adversidades provenientes dos métodos convencionais de administração de fármacos – utilizados mais comumente na forma de cápsulas e comprimidos, em que o agente ativo é liberado de forma imediata e a sua concentração no plasma sanguíneo atinge um máximo à medida que todo o medicamento se dissolve.^[10] Em contrapartida, a liberação sustentada garante a dose terapêutica por um período mais duradouro, diminui a quantidade de dosagens necessárias e evita os níveis subterapêutico e tóxico, diminuindo, portanto, os efeitos colaterais recorrentes quando se administrado o fármaco de modo convencional. A comparação dos níveis plasmáticos de agente ativo em cada uma das administrações pode ser analisada na **Figura 6.**⁵⁵

Figura 6. Variação dos níveis plasmáticos de fármacos quando administrados via (a) liberação convencional (em preto); (b) liberação sustentada (em azul).



Adaptado de ⁵⁵

Diante disso, a liberação sustentada apresenta algumas vantagens sobre a administração convencional de fármacos, entre elas: 1) possibilidade de manter constante a taxa de liberação do princípio ativo por maior período de tempo, de modo que a sua concentração se mantenha constante dentro de uma faixa terapêutica e evitando os níveis tóxico e subterapêutico, que podem causar efeitos colaterais e resistência ao fármaco, respectivamente; 2) garantia de alta seletividade e alta especificidade, de forma a concentrar uma maior quantidade do agente ativo em um local específico, evitando o acúmulo onde não se deseja a ação da substância, de modo a contribuir na diminuição da toxicidade; 3) capacidade de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, que em suas formas livres possuem dificuldade para adentrar no interior de células; 4) proteção do composto encapsulado de ambientes que podem causar a sua degradação.⁵⁶

Nos mais de 50 anos de pesquisas voltadas a sistemas de liberação sustentada, uma grande quantidade de dispositivos eficientes já foi desenvolvida, sendo eles lipossomas, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, ciclodextrinas, nanogéis, entre outros.⁵⁷⁻⁵⁹ No entanto, são poucos os que permitem uma real aplicabilidade no campo médico, tanto por razões de baixa biocompatibilidade e toxicidade,⁶⁰ quanto por facilidade e custo de síntese. Em 2016, havia cerca de 50 produtos já aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) sendo aplicados clinicamente, dentre eles o Doxil[®], aprovado em 1995, um dispositivo formado por doxorubicina lipossomal PEGuilada, utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer.⁶¹

Tabela 1. Dispositivos de liberação sustentada que se encontram em ensaio clínico.

| Nome | Tipo de partícula | Fármaco | Situação |
|---|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Doxil (Janssen) | Lipossoma | Doxorrubicina | Aprovado FDA (1995) |
| Lupron Depot (Abbvie) | PLGA | Acetato de leuprolida | Aprovado FDA (1998) |
| Marqibo (Spectrum) | Lipossoma | Vincristina | Aprovado FDA (2012) |
| Onivyde (Merrimack) | Lipossoma | Irinotecan | Aprovado FDA (2015) |
| Abraxane (Celgene) | Nanopartículas de albumina conjugada | Paclitaxel | Aprovado FDA (2005, 2012, 2013) |
| BIND – 014 (BIND therapeutics) | PLGA ou PLA | Docetaxel | Em teste (Fase II) |
| Cynviloq (Sorrento) | Micela polimérica | Paclitaxel | Em teste (Fase I) |
| Genexol-PM (Samyang Biopharmaceuticals) | Micela | Docetaxel | Em teste (Fase II) |

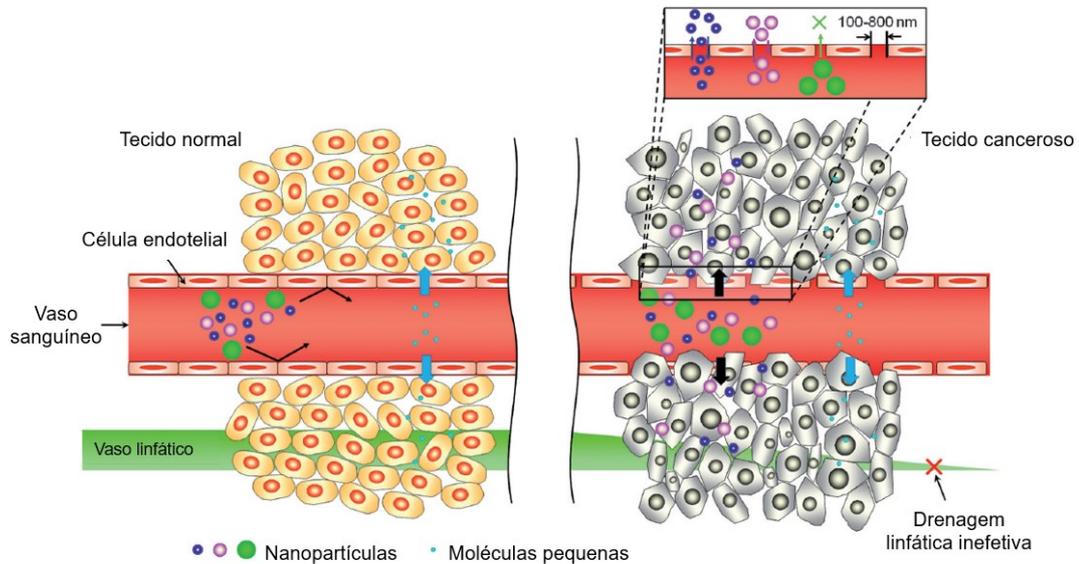
Fonte ^{61,62}

Dentre os sistemas citados, algumas nanopartículas poliméricas têm recebido grande interesse por apresentarem características específicas, como ótima biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de apresentarem baixa toxicidade e imunogenicidade. Por isso, um polímero adequado para compor um sistema carreador deve ser biocompatível, biodegradável, livre de impurezas, não carcinogênico, hipoalergênico, não inflamatório e, ainda, apresentar estabilidade física e química durante e após a encapsulação do agente ativo.⁶³ Alguns polímeros muito utilizados nas sínteses de nanopartículas são álcool polivinílico, ácido polilático, polietileno glicol e poli (ácido lático-co-ácido glicólico), e alguns polímeros naturais, como quitosana e alginato.⁶⁰

Os fármacos, quando em suas formas livres, geralmente são pequenos o suficiente para conseguirem adentrar em quase todos tecidos do organismo, até mesmo os saudáveis que não necessitam de uma ação terapêutica, o que pode causar várias reações adversas danosas ao paciente. Quando incorporados a um sistema carreador, as nanopartículas poliméricas adquirem tamanhos maiores que não conseguem atravessar os tecidos normais do corpo, que apresentam espaço entre as células de 15 – 30 nm. Já tecidos cancerosos, devido ao rápido crescimento e proliferação celular, apresentam formação de vasos mais grosseiros, com maior espaço entre as células (50 – 800 nm), que podem ser atravessados pelos sistemas que carregam o agente

terapêutico. Isso garante que as partículas sejam direcionadas e se acumulem majoritariamente em tecidos específicos que necessitam da ação terapêutica do agente ativo incorporado. Essa é uma forma de direcionamento passivo dos dispositivos de liberação, também conhecido como efeito EPR (*EPR effect – Enhanced Permeability and Retention*) (**Figura 7**).⁶⁴

Figura 7. Direcionamento passivo das nanopartículas para tecidos tumorais – Efeito EPR.

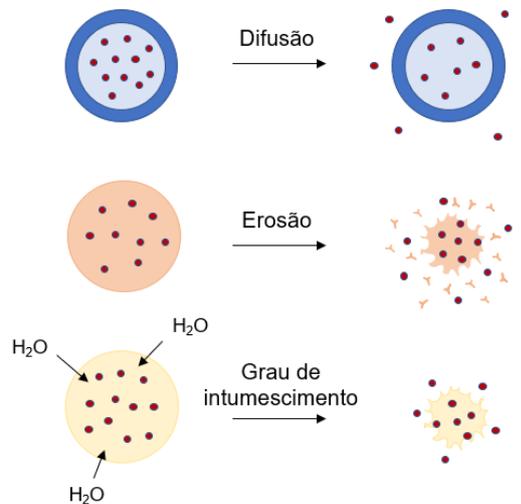


Adaptado de⁶⁴

Outra grande vantagem das nanopartículas poliméricas é a facilidade com que se pode modificar as superfícies desses sistemas, possibilitando o acoplamento de moléculas à estrutura do polímero que aumentam a afinidade das partículas com células específicas, principalmente as cancerígenas. Esse outro tipo de vetorização dos dispositivos de liberação é chamado de direcionamento ativo e pode ser alcançado ligando-se vitaminas, anticorpos, peptídeos e aptâmeros de RNA à cadeia polimérica.⁶⁵

Uma vez garantido o acúmulo das nanopartículas para tecidos específicos, é importante que haja a liberação do composto encapsulado. A liberação pode ocorrer de diferentes formas, dentre elas difusão, grau de intumescimento, erosão do envoltório (**Figura 8**) e, ainda, por meio de estímulos externos, como a variação do pH, que será abordado no tópico seguinte. A predominância de um destes tipos de mecanismo de liberação depende das propriedades do polímero que compõe o sistema.

Figura 8. Representação dos mecanismos de liberação de fármaco a partir de sistemas carreadores.



Adaptado de ⁶⁶

2.3 MATERIAIS INTELIGENTES

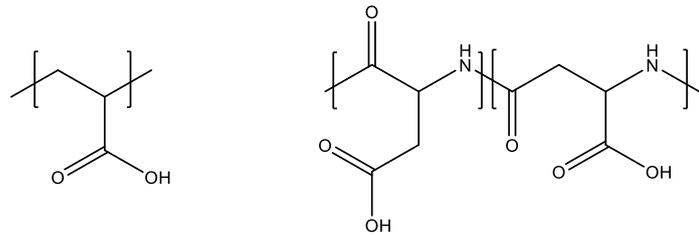
Materiais inteligentes são aqueles que, em resposta a alterações físicas ou biológicas do meio em que se encontram, variam sua estrutura, conformação ou composição.⁶⁷ Os estímulos podem ser externos (temperatura, luz, campo elétrico ou magnético, ultrassom) ou internos (pH, força iônica, potencial de redução).⁶⁸ De modo geral, a rápida resposta dos dispositivos a esses estímulos pode ser utilizada a favor da liberação de um fármaco em um tecido específico e de forma eficiente.

A temperatura é um dos estímulos mais utilizados e eficazes para uma liberação sustentada. Os sistemas termorresponsivos geralmente são compostos por lipossomos, nanopartículas ou micelas poliméricas que apresentam alterações em suas propriedades físicas em resposta à variação da temperatura. Esses dispositivos, idealmente, devem manter o agente ativo encapsulado em temperaturas próximas à temperatura corpórea (~37 °C) e iniciar a liberação em locais que apresentam temperaturas superiores (entre 40 – 42 °C), como é o caso dos tecidos que apresentam inflamações, infecções e tumores.⁶⁸ Alguns polímeros responsivos à temperatura muito utilizados são poli(*N*-isopropil acrilamida) (PNIPAM)^{69–72}, poli(*N,N*-dietilacrilamida) (PDEAM)^{73–75}, poli(metil vinil éter) (PMVE)^{76–78} e poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL).^{79–81}

Os dispositivos que respondem à incidência de irradiação em comprimentos de onda específicos (ultravioleta, visível e infravermelho próximo) são chamados fotorresponsivos e também possuem potencial, uma vez que possibilitam uma liberação sustentada não invasiva e com possibilidade de controle espaço-temporal remoto. A liberação do princípio ativo ocorre por meio de modificações estruturais que são induzidas pela fotossensibilidade dos materiais componentes do sistema carreador. Alguns desses sistemas são de uso único, de forma que a incidência da luz externa provoca uma mudança estrutural irreversível, liberando totalmente o composto encapsulado. Outros sofrem mudanças estruturais reversíveis, sendo possível a liberação de forma pulsátil, quando incidido ciclos de radiação. Um exemplo de material fotossensível é o grupo azobenzó (e seus derivados), que apresentam fotoisomerização trans-cis reversível quando irradiados em comprimentos de onda entre 300 – 380 nm, possibilitando a liberação de compostos encapsulados. A limitação dos comprimentos de onda de luz adequados para utilização em tratamentos clínicos, entretanto, restringe as aplicações não invasivas em tecidos profundos.^{68,82,83}

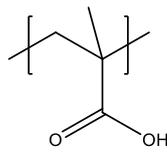
Além desses sistemas, existem aqueles que respondem à variação do pH do meio. Nesse caso, o elemento principal desses materiais é a presença de grupos ionizáveis (pK_a entre 3 – 10) nas estruturas poliméricas, podendo ser ácidos e bases fracas como ácidos carboxílicos e aminas. O mecanismo de liberação desses sistemas se baseia principalmente na ionização desses grupos e o consequente surgimento de forças eletrostáticas de repulsão devido à formação de cargas positivas ou negativas. Em razão disso, após a ionização, as cadeias poliméricas, que inicialmente se encontravam enroladas, se estendem em resposta às forças de repulsão.⁸⁴ Alguns polímeros utilizados para a obtenção de materiais pH-sensitivos são poli(ácido acrílico) (PAA)⁸⁵⁻⁸⁸, poli(ácido metacrílico) (PMAA)⁸⁹⁻⁹², poli(ácido aspártico) (PAsp)⁹³⁻⁹⁵, poli(2-diisopropilaminoetil metacrilato) (PDPAEMA)⁹⁶⁻⁹⁹, entre outros. A estrutura química desses polímeros pode ser observada na **Figura 9**.

Figura 9. Estrutura química dos polímeros pH-responsivos citados.

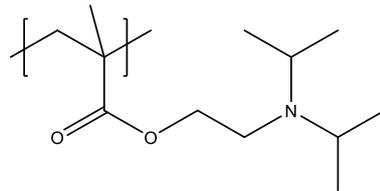


Poli (ácido acrílico)

Poli (ácido aspártico)



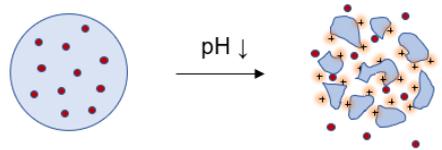
Poli (ácido metacrílico)



Poli (2-diisopropilaminoetil metacrilato)

Fonte ⁹⁶

Figura 10. Representação ilustrativa de uma liberação pH-responsiva.



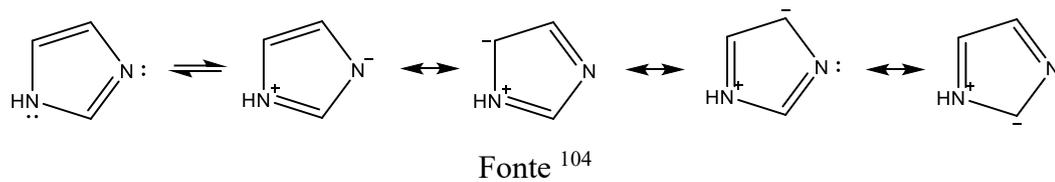
Adaptado de ¹⁰⁰

A funcionalização do polímero com grupos ionizáveis permite a obtenção de sistemas pH-responsivos, à medida que esses grupos podem receber ou doar prótons e função do pH do meio. Estes materiais apresentam extensa aplicabilidade no tratamento de tumores, uma vez que tecidos cancerosos apresentam pH mais baixo do que tecidos normais. O ambiente ácido dos tumores serve como gatilho para a liberação de fármacos nesses locais especificamente.¹⁰¹

O imidazol é um grupo funcional muito utilizado na síntese de dispositivos inteligentes por ser uma molécula capaz de receber e doar átomos de hidrogênio. O imidazol é uma molécula heterocíclica aromática (**Figura 11**) e apresenta natureza anfótera dependente do pH, em razão da sua capacidade de protonar e desprotonar reversivelmente.¹⁰² Em ambiente ácido, o nitrogênio cujos elétrons não participam da ressonância do anel aromático consegue receber um átomo de hidrogênio, adquirindo, portanto, carga positiva, de modo que a concentração de cargas positivas vai aumentando conforme mais moléculas de imidazol são protonadas.

Conseqüentemente, surge uma força de repulsão eletrostática que é responsável pela desestabilização das partículas, resultando na liberação do conteúdo encapsulado (**Figura 10**).¹⁰⁰ Além disso, a protonação do imidazol causa transição conformacional em sua estrutura, de modo que em meios ácidos o composto é hidrofílico, enquanto que em meios básicos é hidrofóbico.¹⁰³

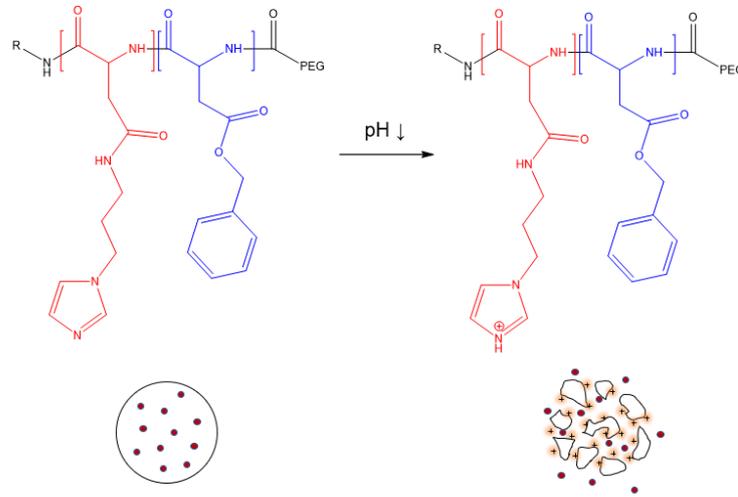
Figura 11. Estrutura química do imidazol e suas estruturas de ressonância.



Um exemplo de material inteligente obtido pela funcionalização de um polímero com imidazol é o poli[(benzil-*L*-aspartato)-co-(*N*-(3-aminopropil) imidazol-*L*-aspartamida)] poli(etileno glicol), sintetizado por Sim *et al.* (2019). O dispositivo sofreu desestabilização estrutural em pH 6.5 devido à protonação do imidazol, causando a liberação do agente ativo encapsulado (docetaxel), mostrando-se adequado para o transporte de fármacos para o tratamento de cânceres e, também, de artrite reumatoide, devido à sua liberação pH-responsiva (**Figura 12**).¹⁰⁰

Su, T. *et al.* (2015) desenvolveram dispositivos pH-responsivos a partir da funcionalização do polímero poli(α,β -ácido málico) com grupos 1-(3-aminopropil)imidazol, para o encapsulamento do fármaco anticâncer doxorubicina (DOX). A liberação do composto ocorreu mais rapidamente em pH 6 quando comparado à sua liberação em pH 7,4, de forma que foi possível demonstrar a viabilidade desse sistema em alcançar uma liberação eficaz e responsiva à variação do pH para um tratamento quimioterápico.¹⁰⁵

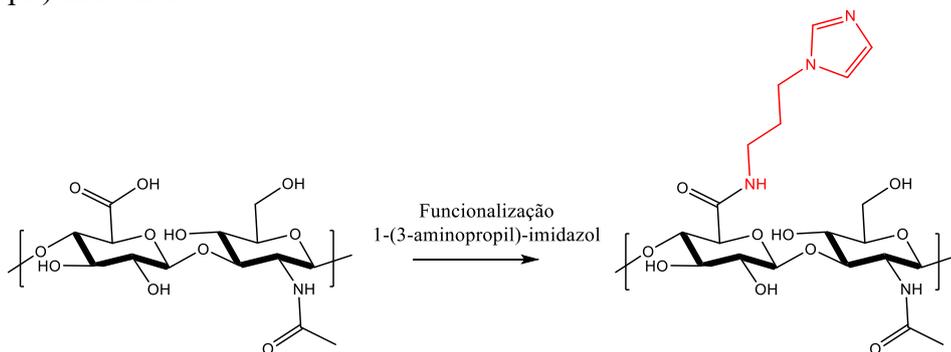
Figura 12. Estrutura do polímero poli[(benzil-*L*-aspartato)-*co*-(*N*-(3-aminopropil) imidazol-*L*-aspartamida)] poli(etileno glicol) e o mecanismo da liberação pH-responsiva em resposta à protonação do imidazol.



Adaptado de ¹⁰⁰

Han, S. *et al.* (2022) funcionalizaram o polímero poli(ácido hialurônico) com grupos imidazol para a liberação pH-responsiva do fármaco DOX (**Figura 13**). A liberação ocorreu com maior eficiência em pH 6,5 do que no pH fisiológico 7,4, confirmando novamente que esses grupos funcionais são boas opções para a obtenção de polímeros pH-sensitivos, que possuem grande potencial para aplicações quimioterapêuticas. ¹⁰⁶

Figura 13. Funcionalização do monômero do poli(ácido hialurônico) com grupos 1-(3-aminopropil)-imidazol.

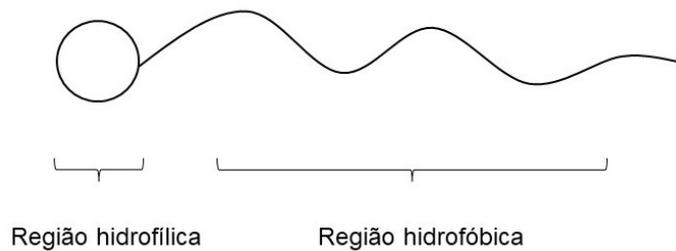


Fonte: ¹⁰⁶

2.4 SURFACTANTES

Os surfactantes, popularmente conhecidos como tensoativos ou detergentes, são compostos orgânicos anfifílicos que apresentam em suas estruturas regiões com polaridades distintas, sendo uma parte polar (hidrofílica) e a outra apolar (hidrofóbica), conforme representado na **Figura 14**. Essa característica permite que sejam solúveis tanto em solventes aquosos quanto orgânicos.

Figura 14. Representação simplificada de um monômero de surfactante.

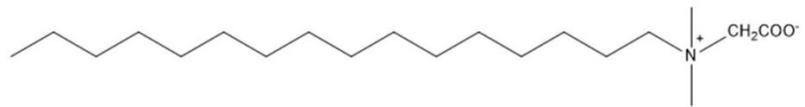


A região polar (“cabeça”) pode ser formada por grupos como sulfato ($-\text{OSO}_3^-$), amônio (NR_4^+) ou polioxetilênico ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_n\text{H}$. Já a região apolar (“cauda”) é formada por uma cadeia carbônica apolar, podendo ter de 10 a 18 átomos de carbono.¹⁰⁷ A classificação dos surfactantes é feita principalmente de acordo com o grupo polar que compõe a molécula, como exemplificado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação e exemplos de surfactantes.

| Surfactante | Exemplo de estrutura |
|-------------|--|
| Catiônico | <p>Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)</p> |
| Aniônico | <p>Dodecil sulfato de sódio (SDS)</p> |
| Não iônico | <p>Alquilfenol etoxilado</p> |

Zwitteriônico



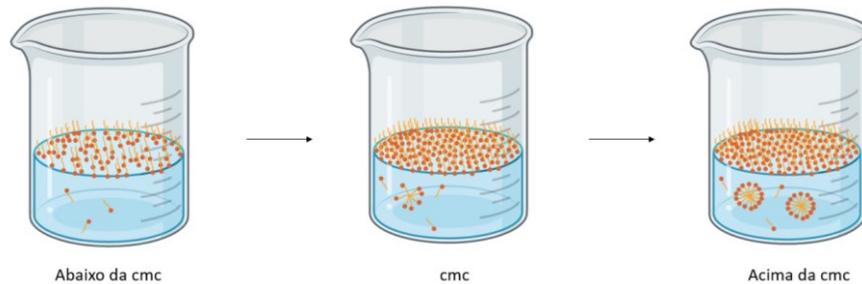
Betaína

Quando adicionados a sistemas heterogêneos, os surfactantes tendem a se acumular na interface de dois líquidos imiscíveis, ou na superfície quando o sistema é composto por líquido-gás. As moléculas são dispostas em uma monocamada, de modo que as partes hidrofóbicas e hidrofílicas fiquem em contato com as fases apolar e polar, respectivamente. O acúmulo de moléculas de surfactantes nessas regiões resulta em alterações de algumas propriedades interfaciais (ou superficiais) do líquido, como a diminuição da tensão interfacial (ou superficial).

À medida em que se adiciona mais surfactante ao sistema, os espaços livres da monocamada tornam-se totalmente ocupados e se inicia, então, a formação de micelas, **Figura 15**. Em outras palavras, a partir de uma determinada concentração limite (concentração micelar crítica, CMC), as moléculas passam a se auto-organizar em aglomerados no interior do líquido, de modo que as regiões apolares das moléculas se aproximam, formando um núcleo hidrofóbico, minimizando o contato dessas partes com a água, e as regiões polares formam uma superfície externa hidrofílica. A partir desse momento, a tensão interfacial (ou superficial) atinge um valor mínimo e a adição de mais surfactante praticamente não causa mais alterações nesse valor.

O processo de micelização é um processo espontâneo resultado de diversas forças intermoleculares, entre elas interações de van der Waals, ligações de hidrogênio, efeito hidrofóbico e forças eletrostáticas e estéricas.^{108,109} Portanto, a formação das micelas pode ser vista como um equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas, sendo o efeito hidrofóbico – associadas às regiões apolares dos monômeros de surfactante – a principal força atrativa e as forças eletrostáticas e estéricas as principais forças repulsivas.¹¹⁰

Figura 15. Processo de micelização em função da concentração de surfactante em solução aquosa.



A minimização da energia livre de Gibbs, resultante da formação das micelas, garante o equilíbrio termodinâmico do sistema. A partir da equação de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T.\Delta S$), tem-se que a energia do sistema é dependente da variação entálpica e entrópica. A contribuição da entalpia para a formação das micelas é baixa à temperatura ambiente, de forma que se pode dizer que a micelização é um processo orientado principalmente pela entropia.¹¹¹ Anteriormente ao início da formação dos aglomerados, os monômeros de surfactante em meio aquoso encontram-se solvatados por moléculas de água que, por estarem próximas a regiões hidrofóbicas do surfactante, interagem entre si por ligações de hidrogênio e adotam uma conformação rígida.¹¹² Após o início da auto-organização, as regiões apolares diminuem o seu contato com o meio aquoso, liberando as moléculas de água e, em razão disso, provocando um aumento na entropia do sistema. Portanto, o termo entrópico está associado à agregação das regiões hidrofílicas dos monômeros, causando a diminuição da entropia, e à quebra da configuração rígida e liberação de moléculas de água, aumentando a entropia.¹¹³⁻¹¹⁵ Por ser um processo termodinamicamente favorável, tem-se que o aumento da entropia conformacional das moléculas de água supera a diminuição da entropia provocada pela agregação das moléculas de surfactante.¹¹⁶

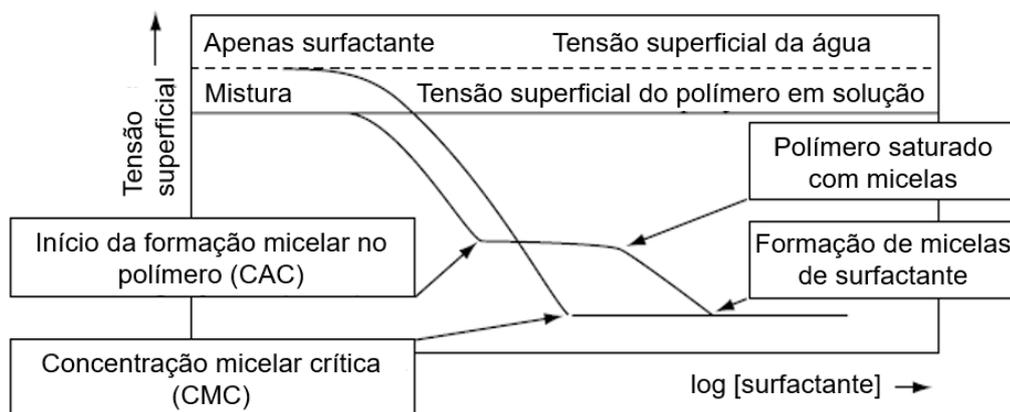
A formação de ambientes apolares no interior das micelas é de grande aplicabilidade quando se deseja aumentar a solubilidade em água de um composto apolar, como é o caso de fármacos hidrofóbicos que apresentam baixa biocompatibilidade e, portanto, rápida taxa de eliminação do organismo e baixa eficiência terapêutica. Diante disso, para sistemas de liberação pH-responsivos, torna-se importante a junção de regiões hidrofóbicas e grupos funcionais, o que pode ser conseguido pela junção de surfactantes e polímeros funcionais.

2.5 INTERAÇÃO POLÍMERO – SURFACTANTE

Polímeros e surfactantes são utilizados em diferentes áreas de aplicação. Quando utilizados juntos, conseguem alcançar diferentes efeitos, como estabilidade coloidal, emulsificação, floculação, controle reológico, entre outros. Por isso, são muito utilizados na produção de cosméticos, tintas, detergentes, alimentos, síntese de polímeros, pesticidas e formulação de sistemas de liberação sustentada de fármacos.¹¹⁷

Uma característica importante de um surfactante é a sua habilidade em diminuir a tensão superficial de um fluido. Logo, a presença de um polímero em solução pode causar alterações nessa propriedade, principalmente quando utilizados surfactantes iônicos. Conforme apresentado na **Figura 16**, em baixas concentrações de surfactante, os monômeros se acumulam na superfície do líquido em uma monocamada, assim como em soluções compostas apenas de surfactante. À certa concentração de surfactante no sistema (concentração agregacional crítica, CAC) os monômeros passam a se aglomerar nas paredes do polímero, de forma que cessa temporariamente o acúmulo na superfície e, portanto, cessa-se também a diminuição da tensão superficial. As micelas se formam, inicialmente, associadas às paredes do polímero. À medida que os polímeros se tornam saturados, os monômeros voltam a ocupar a superfície do líquido (voltando a diminuir a tensão superficial), até que este também se torne saturado e as micelas passam a se formar livremente em solução.

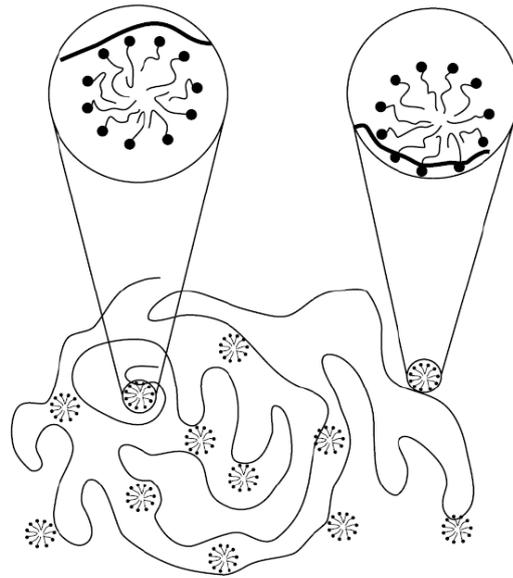
Figura 16. Representação esquemática da diminuição da tensão superficial em função da concentração de surfactante para uma solução de surfactante e uma mistura polímero – surfactante.



Fonte: ¹¹⁸

A interação entre polímeros e surfactantes é melhor representada pelo modelo colar de pérolas (“neck-lace pearl” model), em que as moléculas de surfactante formam agregados micelares ao longo da cadeia polimérica (**Figura 17**). O tamanho das micelas é semelhante àsquelas formadas em sistemas que não apresentam o polímero. Além disso, o número de monômeros que formam uma micela pode ser semelhante ou ligeiramente menor em misturas polímero-surfactante.¹⁰⁷

Figura 17. Modelo colar de pérolas que representa a interação polímero-surfactante.



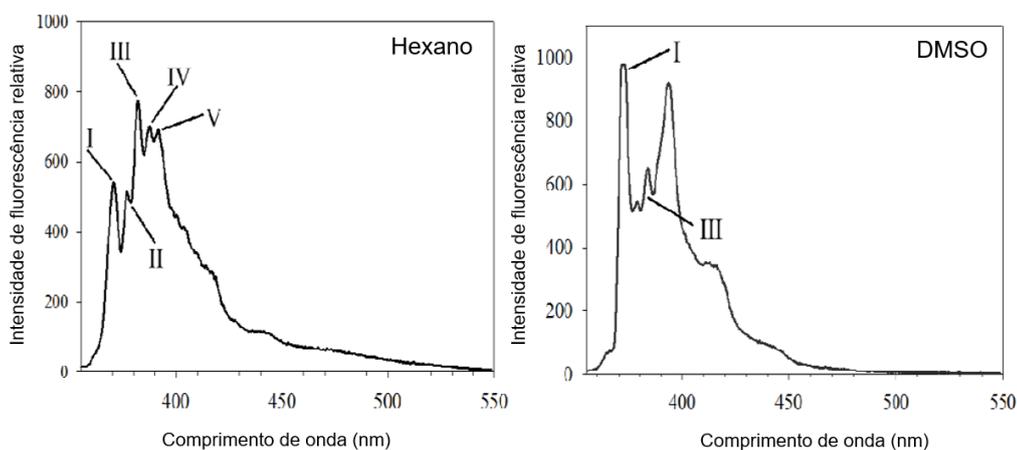
Fonte ¹⁰⁷

As forças que regem a interação entre moléculas de surfactante e o polímero são basicamente as mesmas que regem o processo de micelização em um sistema na ausência do polímero. A principal força, portanto, continua sendo o efeito hidrofóbico, de forma que o contato das partes apolares dos monômeros com a água seja o menor possível. Porém, nessas misturas, há também uma grande contribuição das interações eletrostáticas se as cargas do polímero e do surfactante forem opostas entre si, causando uma interação polímero-surfactante ainda mais forte. No entanto, ainda é necessário levar em consideração a repulsão entre as próprias moléculas de surfactante e as de polímero.^[35]

A formação dos agregados polímero-surfactante pode ser acompanhada de forma prática a partir de espectros de emissão de fluorescência do pireno, que atua como uma sonda espectroscópica quando inserido em um meio que contém surfactantes e/ou polímeros. A utilização do pireno para essa finalidade ocorre, pois os espectros de fluorescência do pireno, que consiste em cinco bandas (numeradas de I a V), são sensíveis à mudança da

micropolaridade do sistema (**Figura 18**).^{119,120} Dong e Winnik (1982) realizaram estudos acerca dos espectros de fluorescência do pireno em diferentes solventes e, a partir disso, propuseram uma escala de polaridade em função das razões entre as intensidades das bandas vibrônicas I (~372 nm) e III (~382 nm). Dessa forma, quanto maior é o valor da razão (I_I/I_{III}), maior é a polaridade do meio. Em solventes polares, como água, o valor é próximo de 2, enquanto que para solventes apolares, como hexano, o valor é próximo de 0,6.¹²¹ Portanto, esse método também possibilita a determinação dos valores de CMC e CAC quando realizado em função das concentrações de surfactante e/ou polímero em um determinado sistema.

Figura 18. Espectros de emissão de fluorescência do pireno em solventes apolar (hexano) e polar (DMSO).

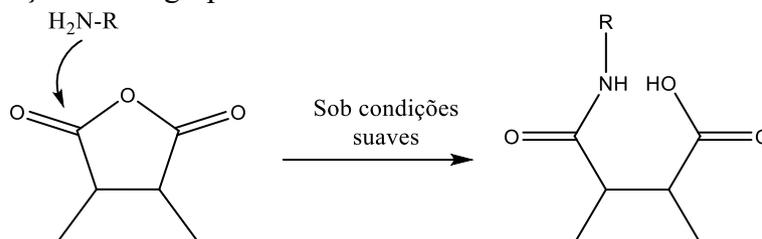


Fonte ¹²⁰

2.6 POLI(METIL VINIL ÉTER -ALT- ANIDRIDO MALEICO) (PMVE-AM)

A funcionalização de polímeros permite a obtenção de novos produtos que possuem propriedades específicas. O polímero comercial poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) (PMVE-AM), possui em sua estrutura polimérica grupos anidridos maleicos, o que facilita a funcionalização devido à abertura dos anéis do anidrido frente a ataques nucleofílicos (**Figura 19**).¹²² A clivagem do anel dá origem a dois grupos carboxílicos, sendo que um deles é utilizado para a ligação, geralmente com aminas ou álcoois. No entanto, nem todos os anéis se rompem, mesmo em excesso de amina ou álcool no meio reacional.¹²³

Figura 19. Ataque nucleofílico de uma amina à um anidrido maleico, resultando na clivagem no anel e a formação de um grupo amida.



Adaptado de ¹²⁴

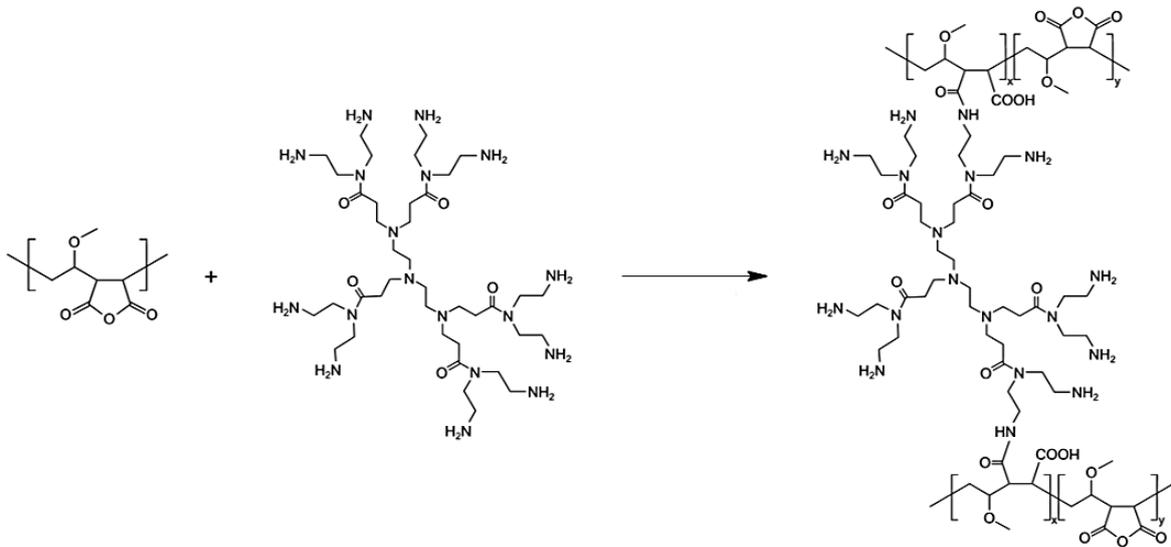
Os registros de obtenção de polímeros modificados a partir da reação com grupos anidridos datam desde 1985, quando Maeda *et al.* obtiveram polímeros poli(estireno-co-anidrido maleico) funcionalizados pelo grupo amina presente na estrutura química do fármaco antitumoral neocarzinostatina, aumentando, assim, as suas propriedades farmacológicas.¹²⁵ Desde então, a modificação de anidridos maleicos tem sido amplamente utilizada para a obtenção de novos materiais.¹²⁶

Ceglowski, Gierczyk e Schroeder (2014) funcionalizaram o poli(metil vinil éter -alt-anidrido maleico) (PMVE-AM) com moléculas de ácido 3-aminofenilborônico para a obtenção de um polímero inédito, utilizado como um sensor para a determinação de constantes de associação de diferentes dióis em reações competitivas. Além disso, o polímero apresentou alta afinidade com ribonucleosídeos, principalmente citidina e uridina.¹²³

Pawlaczyk M. e Schroeder G. (2019) também utilizaram o (PMVE-AM), porém dessa vez funcionalizado com dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) (**Figura 20**). Foram obtidos polímeros que apresentaram grande potencial para a sua implementação tanto na remoção de contaminantes de águas residuais quanto no desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada de fármacos.¹²⁶

O polímero de partida (PMVE-AM), utilizado neste trabalho, apresenta algumas características que o tornam um material com grande potencial em aplicações médicas e farmacêuticas, sendo uma delas o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos. Além de ser biodegradável, apresentar baixa toxicidade, alta biocompatibilidade e propriedades bioadesivas importantes ¹²⁷⁻¹²⁹, o polímero já apresentou, também, características vantajosas para o encapsulamento e a liberação sustentada de compostos.¹³⁰⁻¹³⁴

Figura 20. Funcionalização do (PMVE-AM) com (PAMAM).



Fonte ¹²⁶

Elizondo *et al.* (2011) investigaram pela primeira vez metodologias para a preparação de partículas de (PMVE-AM) sem a utilização de solventes para o encapsulamento de fármacos. Foi utilizado a gentamicina (Gm), um antibiótico usado no tratamento de infecções bacterianas, como fármaco modelo. Os resultados indicaram que as metodologias antissolvente foram adequadas para a obtenção de sistemas carreadores, com uma liberação sustentada durante 30 dias. ¹³¹

Zabaleta *et al.* (2012) estudaram o potencial uso de nanopartículas de (PMVE-AM)-PEGuilada para a liberação sustentada via oral do paclitaxel (PTX), um fármaco anticâncer que possui baixa solubilidade em água. Os estudos indicaram que a encapsulação do composto nas nanopartículas aumentou a biocompatibilidade e a biodisponibilidade do PTX no plasma sanguíneo quando administrado em ratos. Ainda, foram observados níveis plasmáticos terapêuticos do fármaco por pelo menos 48 horas, podendo concluir, portanto, que a liberação ocorreu de forma sustentada. ¹³²

Larrañeta *et al.* (2018) desenvolveram hidrogéis baseados em (PMVE-AM) e surfactante Tween 85 para a liberação sustentada de fármacos hidrofóbicos. Os sistemas obtidos contendo porções hidrofóbicas melhoraram a sua afinidade com compostos hidrofóbicos. O processo sintético foi simples e, por não necessitar de solventes tóxicos ou orgânicos, garantiu que os dispositivos obtidos eram seguros (não tóxicos) para utilização em tratamentos médicos e, também, ecologicamente corretos. A curcumina foi utilizada nesse estudo como modelo de

molécula hidrofóbica e a sua liberação foi sustentada por 30 dias. Diante disso, o material apresentou grande potencial para aplicação em sistemas de liberação de fármacos a longo prazo, como implantes. ¹³³

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver sistemas de liberação de curcumina pH-responsivos para a região do cólon utilizando o polímero poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) (PMVE-AM) funcionalizado com 1-(3-aminopropil)-imidazol em complexos supramoleculares polímero-surfactante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Funcionalizar o polímero comercial poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) (PMVE-AM) com 1-(3-aminopropil)-imidazol (APIM), e caracterizar o polímero funcionalizado (PMVEAIM) através de espectroscopia no infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), titulação potenciométrica e análise elementar (CHN);

Caracterizar a curcumina e a interação Curcumina/PMVEAIM através de espectrofotometria de absorção UV-Vis e espectroscopia de fluorescência;

Avaliar a auto-organização do polímero PMVEAIM na ausência e na presença do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) através de espectroscopia de fluorescência, utilizando o pireno como sonda espectroscópica;

Analisar o tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta dos aglomerados de PMVEAIM/CTAB na presença e ausência de curcumina;

Avaliar estabilidade da curcumina em sua forma livre e encapsulada nos complexos polímero-surfactante em pH 3 e 7;

Investigar a liberação de curcumina dos complexos polímero-surfactante em pH 3 e 7.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados PMVE-AM ($MW \sim 1080000 \text{ g mol}^{-1}$), APIM, sonda espectroscópica pireno, curcumina, ácido cítrico, bis-tris, tris e os solventes (etanol, acetona, éter etílico, DMSO) foram adquiridos da Sigma Aldrich e utilizados conforme recebidos. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água deionizada.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Caracterização espectroscópica da curcumina

4.2.1.1 Espectrofotometria de absorção eletrônica e de fluorescência da curcumina em meio homogêneo

Os espectros de absorção da curcumina ($2,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram registrados em um espectrofotômetro Varian Cary® 50 Bio, em DMSO, etanol, e meio aquoso em pH 3, 6 e 9. Utilizaram-se os tampões citrato, bis-tris e tris ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) para a preparação dos tampões em pH 3, 6 e 9, respectivamente. O coeficiente de absorvidade molar da curcumina em 423 nm em etanol foi determinado utilizando a lei de Lambert-Beer, equação 1:

$$A = b c \varepsilon \quad (1)$$

Onde A é a intensidade de absorção em 423 nm, b é o caminho óptico (1cm), c é a concentração da curcumina (mol L^{-1}), e ε é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A reta obtida para a determinação do valor de coeficiente de absorvidade molar apresentou $R^2 = 0,9999$.

As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Varian, modelo Cary Eclipse, disponibilizado no laboratório de catálise e fenômenos interfaciais, LACFI, no departamento de química da UFSC. As amostras de curcumina ($2,1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) foram preparadas em etanol, DMSO e soluções aquosas em pH 3, 6 e 9, e $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$. O rendimento quântico de fluorescência é uma medida do número de fótons emitidos por uma molécula, em razão do número de fótons absorvidos (equação 2), e pode ser calculado pelo método relativo a um padrão conhecido utilizando a equação 3.

$$\Phi_F = \frac{n^\circ \text{ de f\u00f3tons emitidos}}{n^\circ \text{ de f\u00f3tons absorvidos}} \quad (2)$$

e,

$$\Phi_F = \Phi_F^{Std} \frac{F \cdot A_{Std} \cdot n_{Std}^2}{F_{Std} \cdot A \cdot n^2} \quad (3)$$

sendo, Φ_F o rendimento qu\u00e2ntico de fluoresc\u00eancia; Φ_F^{Std} o rendimento qu\u00e2ntico de fluoresc\u00eancia do padr\u00e3o (0,05 em DMSO); F e F_{Std} as \u00e1reas de emiss\u00e3o do composto e do padr\u00e3o respectivamente; A e A_{Std} as absorv\u00eancias do composto e do padr\u00e3o, respectivamente.

O deslocamento de Stokes, referente \u00e0 diferen\u00e7a λ entre os comprimentos de onda de m\u00e1xima absor\u00e7\u00e3o e de m\u00e1xima emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia, foi calculado pela equa\u00e7\u00e3o 4:

$$\Delta\lambda = \lambda_f^{max} - \lambda_a^{max} \quad (4)$$

em que λ_f^{max} corresponde ao comprimento de onda de m\u00e1xima emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia, e λ_a^{max} ao comprimento de onda de m\u00e1xima absor\u00e7\u00e3o.

4.2.2 Funcionaliza\u00e7\u00e3o do pol\u00edmero PMVE-AM

Em um bal\u00e3o de fundo redondo, foram adicionados 3,0 g (19,2 mmol) do pol\u00edmero comercial poli(metil vinil \u00e9ter -alt- anidrido maleico) (PMVE-AM) e 15 ml de acetona, a 25 \u00b0C com agita\u00e7\u00e3o magn\u00e9tica. Ap\u00f3s a dissolu\u00e7\u00e3o do pol\u00edmero, 3,4 ml (28,5 mmol) de 1-(3-aminopropil)-imidazol (APIM) em 25 ml de acetona foram adicionados gota-a-gota lentamente \u00e0 solu\u00e7\u00e3o. A rea\u00e7\u00e3o foi mantida a 25 \u00b0C com agita\u00e7\u00e3o magn\u00e9tica por 24 horas.

Ao t\u00e9rmino da rea\u00e7\u00e3o, o produto obtido foi centrifugado e lavado com 15 ml de acetona. Foram realizadas tr\u00eas lavagens, seguido por uma lavagem com 15 ml de \u00e9ter et\u00edlico. Os sobrenadantes foram retirados em cada lavagem. Por fim, o material obtido foi mantido a v\u00e1cuo a 60 \u00b0C por 24 horas para secagem e armazenado em dessecador para posterior utiliza\u00e7\u00e3o.

4.2.3 Caracteriza\u00e7\u00e3o do pol\u00edmero funcionalizado (PMVEAIM)

4.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (IR)

As an\u00e1lises foram realizadas em espectrofot\u00f4metro Bruker, modelo Alpha, na regi\u00e3o de 4000 a 400 cm^{-1} com resolu\u00e7\u00e3o de 2 cm^{-1} disponibilizado pela central de an\u00e1lises, no

departamento de química da UFSC. As amostras foram preparadas utilizando-se pastilhas de KBr, grau espectroscópico.

4.2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H)

Os espectros de RMN de 1H foram obtidos por espectrômetro Bruker 200 MHz. O padrão interno utilizado para as análises foi o tetrametilsilano (TMS). A amostra do PMVE-AM foi preparada em acetona deuterada e a amostra do PMVEAIM em água deuterada.

4.2.3.3 Análise Elementar (CHN)

As análises foram realizadas em analisador elementar CHNS/O PerkinElmer, modelo 2400 series II, acoplado com balança modelo autobalance ad 6000 perkinelmer, disponibilizado na central de análises, no departamento de química da UFSC.

4.2.3.4 Titulação Potenciométrica

As medidas foram realizadas em um titulador automático modelo Titronic universal e pHmetro metrohm, modelo 827 pHlab. A amostra foi preparada adicionando-se 30 mg de PMVEAIM em 25 ml de água deionizada ($6,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Antes do início da adição do titulante (KOH, $0,97 \text{ mol l}^{-1}$), o pH da solução foi ajustado para 2 adicionando-se HCl. Os resultados obtidos foram tratados com auxílio do programa CurTiPot.

4.2.4 Estudo da auto-organização do PMVEAIM (com e sem surfactante)

4.2.4.1 Avaliação da formação de microambientes através do pireno como sonda fluorescente de polaridade

Os estudos de auto-organização do polímero, PMVEAIM, na ausência e na presença do surfactante, cetiltrimetilamônio (CTAB), foram realizados utilizando o pireno como sonda fluorescente. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em espectrofotômetro de fluorescência Varian, modelo Cary Eclipse, disponibilizado no laboratório de catálise e fenômenos interfaciais, do departamento de química da UFSC. As amostras foram preparadas adicionando-se volumes conhecidos do PMVEAIM ($C_{\text{estoque}} = 8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a uma solução aquosa de pireno ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). A formação de complexos polímero/surfactante foi avaliada em pH 3, 6 e 9, adicionando-se CTAB a soluções de PMVEAIM ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) contendo

pireno (1×10^{-6} mol L⁻¹). Para as medidas de emissão de fluorescência o λ_{exc} foi de 432 nm, a leitura de 450 a 800 nm e as fendas de emissão e excitação foram de 5 nm.

4.2.4.2 Tamanho médio e potencial zeta dos agregados

As medidas de tamanho médio e do potencial zeta dos agregados foram realizadas em um Zetaplus, Brookhaven. As soluções de PMVEAIM (1×10^{-4} mol L⁻¹) e diferentes concentrações de CTAB foram preparadas em tampão de ácido cítrico (pH 3), bis-tris (pH 6) e tris (pH 9).

4.2.5 Preparação de sistemas de liberação nanoparticulados baseados em complexos polímero/surfactante na presença e na ausência de curcumina

Para a caracterização do sistema de liberação, inicialmente preparou o complexo nanoestruturado na ausência de curcumina. Para isso preparou-se soluções aquosas (2 mL água deionizada) de PMVEAIM ($0,0142$ mol L⁻¹) e CTAB ($0,0137$ mol L⁻¹). As soluções foram homogeneizadas e levadas ao ultrassom por 10 minutos. Em seguida, o polímero foi adicionado gota-a-gota à solução contendo o surfactante com agitação magnética e temperatura ambiente.

A incorporação da curcumina no sistema de liberação seguiu a metodologia anterior, adicionando 2 mg de curcumina à solução de surfactante (2 mL). Após a homogeneização das soluções de polímero e CTAB contendo curcumina, estas foram levadas ao ultrassom durante 10 min. A curcumina não solubilizada foi separada por centrifugação em rotação de 6000 rpm durante 10 min (mini centrifuge Interprise). Após, a solução de polímero foi adicionada gota-a-gota à solução contendo o surfactante e curcumina com agitação magnética e temperatura ambiente.

4.2.5.1 Determinação do tamanho hidrodinâmico e do potencial zeta dos sistemas de liberação nanoestruturados na ausência e presença de curcumina

As medidas de tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas na ausência e presença de curcumina foram realizadas em um Zetaplus, Brookhaven. As soluções foram preparadas pela diluição de 100 μ L do formulado previamente preparado a diferentes soluções tamponantes (volume 1,5 mL). As medidas foram realizadas em função do tempo (em pH 3 e 7), do pH e da temperatura.

4.2.5.2 Encapsulamento de curcumina

A quantidade de curcumina encapsulada foi determinada a partir do espectro de absorção da curcumina em etanol, obtido por espectrofotômetro Varian Cary® 50 Bio, e da equação de Lambert-Beer (1). Foram adicionados 20 µL do formulado preparado contendo curcumina em 2 mL de etanol, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

4.2.6 Cinética de degradação da curcumina livre e encapsulada

As cinéticas de degradação da curcumina foram acompanhadas em um espectrofotômetro Varian Cary® 50 Bio, em função do tempo (66,7 horas), utilizando o software do equipamento para a obtenção e o tratamento dos dados. As reações foram realizadas em cubetas de quartzo de caminhos ópticos de 1,0 cm. As amostras foram preparadas com a curcumina (3×10^{-5} mol L⁻¹) em suas formas livre e encapsulada, nos pH 3, 7 e 9.

As cinéticas de degradação foram ajustadas aos modelos cinéticos de 1ª ordem (equação 5) e com duas etapas consecutivas em 1ª ordem.

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (5)$$

Onde A é a absorbância em função do tempo (t), A_0 é a absorção do tempo inicial, e k é a constante de velocidade.

4.2.7 Cinética de liberação

A cinética de liberação da curcumina foi acompanhada por espectrofotômetro Varian Cary® 50 Bio. Os espectros foram obtidos em função do tempo (30 horas), em pH 3 e 7. As amostras foram preparadas adicionando-se 500 µL do formulado preparado contendo curcumina ($[\text{Cur}] = 2,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em 10 mL de tampão (ácido cítrico – pH 3 e bis-tris – pH 7), de forma que a concentração final de curcumina no sistema foi de $1,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A cada medida, em tempos específicos, foram retirados 1 mL de amostra e, após a medida, retornou-se o volume para o sistema. Os dados obtidos foram tratados e as curvas de cinética foram ajustadas utilizando modelos de primeira ordem e duas etapas consecutivas de primeira ordem.

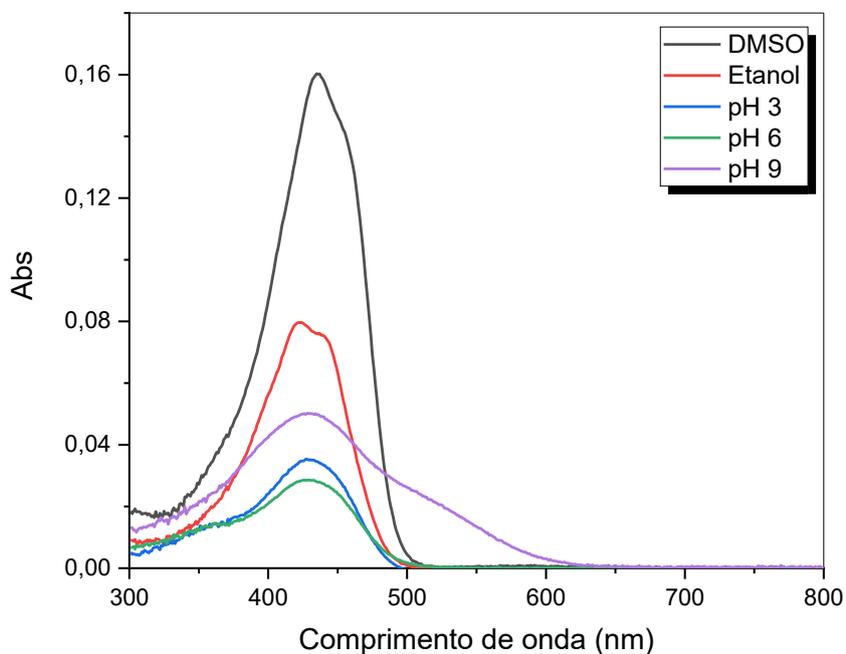
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA CURCUMINA LIVRE

5.1.1 Caracterização Espectroscópica da curcumina

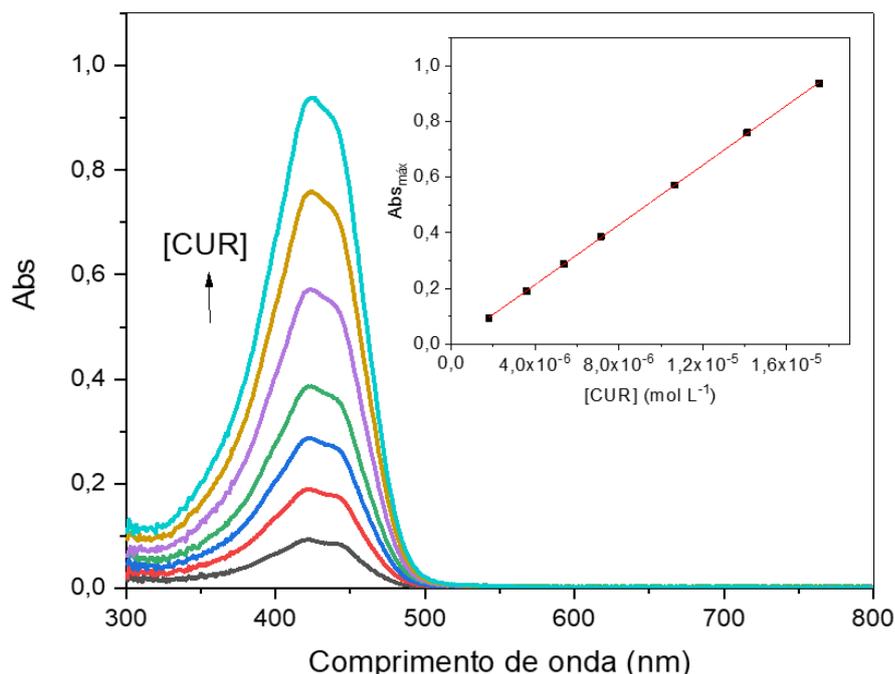
As medidas de absorção da curcumina foram realizadas em diferentes solventes, sendo eles DMSO, etanol e água (tampões pH 3, 6 e 9). Os espectros de absorção da curcumina nos diferentes meios encontram-se na **Figura 21**. O comprimento de onda de máxima absorção da curcumina apresenta-se entre 420 – 440 nm, e é decorrente das transições eletrônicas dos orbitais $\pi - \pi^*$ do sistema conjugado da estrutura química da curcumina.¹³⁶ Em DMSO, etanol e meio aquoso, a curcumina apresenta uma banda intensa e com pequena resolução estrutural, como esperado para os solventes polares.³¹ Essa banda em 420 nm é típica da forma enol da curcumina, como discutido previamente na revisão bibliográfica. Em DMSO, espera-se que a curcumina encontre-se na forma enólica, devido à transferência intramolecular de um átomo de hidrogênio para um dos oxigênios da dicetona. Já os solventes polares próticos são passíveis de interagir com o hidrogênio do enol, de forma a romper a ligação de hidrogênio intramolecular, resultando na conversão da forma enólica para a ceto.²³ Portanto, a interação do etanol com a estrutura da curcumina por meio de ligações de hidrogênio pode contribuir para a diminuição da intensidade de absorção em 420 nm em comparação ao DMSO, além do aparecimento de uma banda de menor intensidade em 350 nm característica da forma ceto da curcumina. A diminuição da intensidade de absorção em 420 nm é ainda maior nos sistemas aquosos, o que pode ser explicado por interações específicas da curcumina com solventes polares próticos, além disso, a baixa solubilidade da curcumina em água pode levar a autoagregação da curcumina, levando a diminuição da intensidade de absorção.¹³⁷ Ainda em meio aquoso as maiores alterações foram observadas no pH 9, com alargamento da banda de absorção e aparecimento de um ombro na região de 550 nm. Isso acontece devido a ionização do grupo OH fenólico e formação do íon fenóxido, o que aumenta a conjugação eletrônica e a solubilidade da molécula em meio aquoso.²³

Figura 21. Espectros de absorção eletrônica da curcumina ($2,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em meio aquoso (pH 3, 6 e 9), DMSO e etanol.



Uma vez que a concentração de curcumina pode ser facilmente determinada por espectroscopia de absorção eletrônica, determinou-se o coeficiente de absorvidade molar da curcumina em etanol. Os espectros de absorção da curcumina em diferentes concentrações são apresentados na **Figura 22**. A intensidade de absorção em 423 nm em função da concentração de curcumina é mostrada no inserte (**Figura 22**), a partir desses dados e da regressão linear da equação da equação, $A = bc\epsilon$ (Lei de Beer), determinou-se o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da curcumina em etanol ($53,7 \pm 0,2$) $\times 10^3$ L mol⁻¹ cm⁻¹, em concordância com o reportado na literatura de Zsila.²⁸

Figura 22. Espectro de absorção da curcumina em diferentes concentrações, em etanol. O inserte mostra a absorção da curcumina em 423 nm em função da concentração.

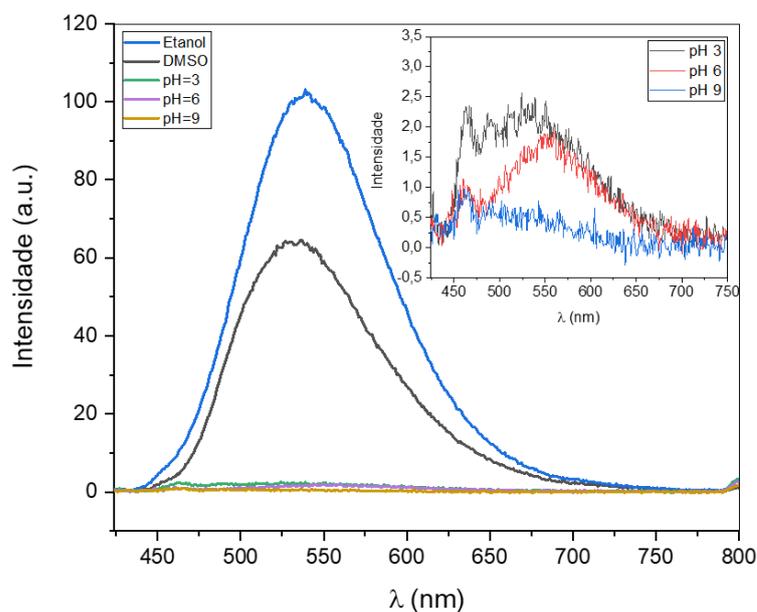


Os espectros de emissão de fluorescência da curcumina foram obtidos em DMSO, etanol e meio aquoso (pH 3, 6 e 9) (**Figura 23**). Nos espectros de emissão de fluorescência, observou-se a maior intensidade de emissão em etanol, e na sequência DMSO, enquanto em meio aquoso a intensidade de emissão foi quase nula. Assim como nas medidas de absorção, a emissão de fluorescência da curcumina também é bastante sensível a diferentes solventes, principalmente os orgânicos. Algumas características físico-químicas dos solventes, como polaridade, natureza das ligações π e a possibilidade de doar ou receber prótons, influenciam nas propriedades fotofísicas do estado excitado da curcumina.²³ Isso ocorre devido a diferente estabilização dos estados fundamental e excitado do soluto pelo solvente, como explica o princípio de Franck-Condon. Essas interações refletem nos espectros de fluorescência, na posição, na intensidade, no formato da banda de emissão e no tempo de vida dos estados excitados.²³

Os valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) foram calculados a partir da equação 3, são relacionados à razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos de uma molécula quando excitada. Nos meios avaliados, a curcumina apresentou maior rendimento quântico em etanol do que em DMSO, enquanto em meio aquoso os valores de Φ_f foram extremamente pequenos. A maior emissão da curcumina em etanol do que em

DMSO pode ser explicada em razão do etanol apresentar menor momento dipolar do que o DMSO (1,69 D e 3,96 D, respectivamente), confirmando a interferência da natureza dos solventes sobre o comportamento espectroscópico da curcumina. Além disso, solventes doadores e receptores de prótons, como álcoois, conseguem estabilizar tanto a forma ceto da curcumina, ao doar prótons, quanto com a forma enólica, ao receber prótons. O DMSO, sendo um solvente polar aprótico, consegue apenas receber prótons, de forma a não favorecer a forma enólica da curcumina.²³ Além disso, os baixos valores de rendimento quântico de fluorescência indicam que os processos de decaimento não-radiativos são predominantes para o retorno ao estado fundamental da curcumina. A respeito dos rendimentos quânticos de fluorescência da curcumina em água, conhecidamente, a solubilidade da curcumina em meio aquoso é muito pequena, o que pode levar a sua autoagregação e autossupressão de energia dos estados excitados, resultando na drástica diminuição da intensidade de emissão. Ainda foi possível notar que, quando desprotonada (pH 9), a curcumina apresentou o menor valor de Φ_f . Estudos indicam que os valores de rendimento quântico para a curcumina é praticamente inexistente quando nas espécies $CURH_2^-$ e $CURH^{2-}$, porém há um aumento em pH maiores quando há surgimento de espécies CUR^{3-} .¹³⁵ Os baixos valores de rendimento quântico para a curcumina em meios aquosos também podem ser atribuídos à formação dos complexos de transferência de carga curcumina⁻ H_2O^+ .¹³⁸

Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência da curcumina em diferentes solventes. $[Cur] = 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$; Emissão = 420 – 800 nm; fendas de emissão e excitação de 2,5 e 10 nm, respectivamente.



A partir dos espectros de emissão e absorção da curcumina (**Figura 24**), e da equação 4, foi possível calcular o deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda$) em diferentes meios. Os valores de $\Delta\lambda$ são apresentados na **Tabela 3**, e variam de acordo com o solvente utilizado. Uma explicação para o efeito do solvente no espectro de fluorescência é a solvatação diferencial das moléculas fluorescentes nos estados fundamental e excitado, mediado por várias forças intermoleculares não-específicas e específicas atuando entre o soluto e o solvente. A maior parte dos fluoróforos se submetem a transferência de carga intramolecular quando excitados, o que causa um aumento do momento de dipolo da molécula excitada, superando o momento de dipolo da molécula no estado fundamental. Ou seja, a molécula se encontra mais polar no estado excitado. Portanto, aumentar a polaridade do solvente estabiliza a transferência de carga intramolecular do estado excitado em relação ao estado fundamental. Quanto mais forte é a interação de um solvente com um fluoróforo, menor é a energia do estado excitado, e maior é o deslocamento para o vermelho da banda de emissão e o deslocamento de Stokes correspondente. Para a curcumina, o deslocamento de Stokes para o DMSO foi um pouco maior do que para o etanol, o que pode ser relacionado ao maior momento de dipolo do primeiro solvente, que pode aumentar a estabilização do estado excitado da curcumina. Em meio aquoso, um comportamento distinto foi observado em pH 9, com $\Delta\lambda$ superior a 300 nm, o que é consequência da ionização da curcumina neste pH.

Figura 24. Diferença dos máximos de comprimentos de onda de absorção e emissão de fluorescência (deslocamento de Stokes) para a curcumina em DMSO.

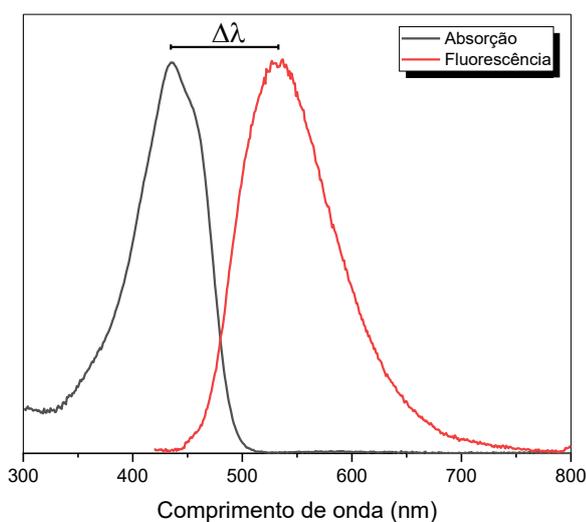


Tabela 3. Valores de comprimento de onda de maior intensidade de absorção (λ_a^{\max}), emissão de fluorescência (λ_f^{\max}), deslocamento de estoque ($\Delta\lambda$) e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) para a curcumina em diferentes meios.

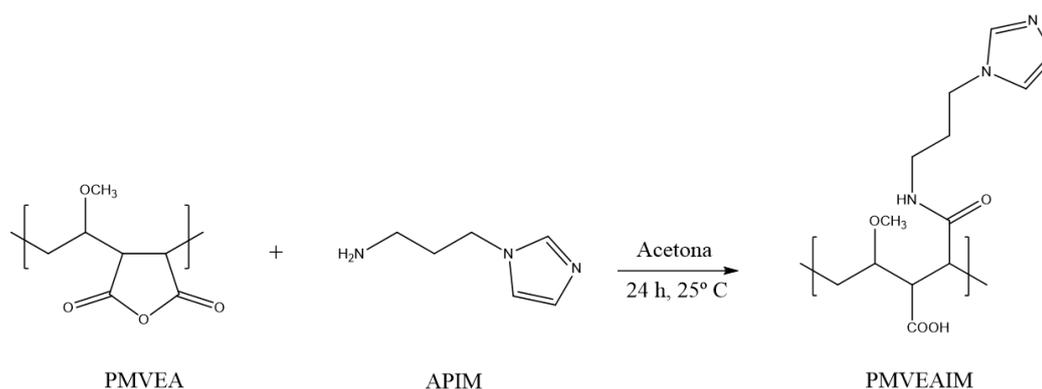
| | λ_f^{\max} (nm) | λ_a^{\max} (nm) | $\Delta\lambda$ (10^3 cm ⁻¹) | Φ_F |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|---|----------|
| DMSO | 538 | 434 | 96,1 | 0,05* |
| Etanol | 533 | 423 | 90,9 | 0,14 |
| Água (pH 3) | 505 | 428 | 129,8 | 0,008 |
| Água (pH 6) | 559 | 428 | 76,3 | 0,005 |
| Água (pH 9) | 459 | 428 | 322,5 | 0,0015 |

*Curcumina em DMSO utilizada como padrão¹³⁵

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO

A funcionalização do polímero de partida poli(metil vinil éter -alt- anidrido maleico) (PMVE-AM) ocorreu via ataque nucleofílico de grupos aminas do 1-(3-aminopropil)-imidazol (APIM) à uma das carbonilas do anidrido maleico do polímero original, resultando na ruptura do anel, a formação da amida e a entrada do APIM na estrutura do polímero, conforme apresentado no **Esquema 1**.

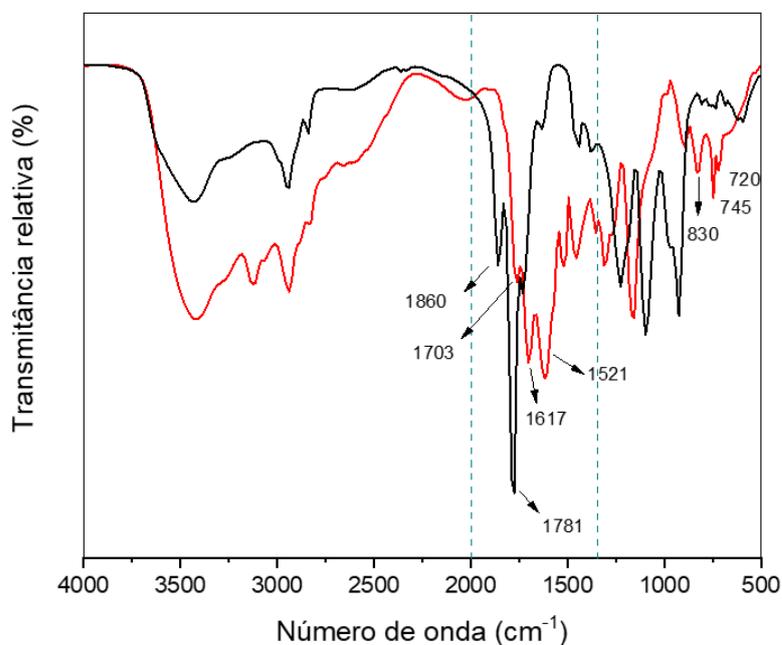
Esquema 1. Funcionalização do polímero comercial PMVE-AM com APIM, para a obtenção do PMVEAIM.



O polímero funcionalizado PMVEAIM foi inicialmente caracterizado por espectroscopia no infravermelho (IV). Os espectros de infravermelho obtidos para o polímero, antes e após a funcionalização (PMVE-AM e PMVEAIM), são apresentados na **Figura 25**. O PMVE-AM apresenta diferentes bandas características que possibilitam sua caracterização:

3500 cm^{-1} – deformação axial C–H; 2946 cm^{-1} – estiramento axial assimétrico CH_2 ; 2831 cm^{-1} – estiramento axial simétrico CH_2 ; 1860 e 1781 cm^{-1} – deformação simétrica e assimétrica C=O do anidrido maleico; 1229 cm^{-1} – deformação axial C–O (anidrido maleico); 1099 cm^{-1} – deformação axial C–O (éter); 926 cm^{-1} – deformação angular C–H; 608 cm^{-1} – deformação angular C=O. Com a abertura do anel e funcionalização do polímero (PMVEAIM), observa-se o desaparecimento das deformações simétrica e assimétrica C=O do anidrido, em 1860 e 1781 cm^{-1} , respectivamente,¹²⁴ e o aparecimento da banda de deformação axial C=O de amida em 1617 cm^{-1} e de deformação axial C=O de ácido carboxílico em 1703 cm^{-1} . A presença do grupo imidazol no polímero funcionalizado também pode ser verificada pelo aparecimento de bandas características de deformação angular N–H para fora do plano em 830 cm^{-1} e de deformação angular C–H fora do plano do anel aromático em 745 e 720 cm^{-1} .¹³⁹ Outras bandas utilizadas na caracterização do PMVEAIM são: 3425 cm^{-1} – deformação axial O–H (ácido carboxílico); 3125 cm^{-1} – deformação axial N–H; 2937 cm^{-1} – estiramento axial assimétrico CH_2 ; 2831 cm^{-1} – estiramento axial simétrico CH_2 ; 1515 cm^{-1} – deformação angular N–H; 1458 cm^{-1} – deformação angular CH_2 no plano; 1164 cm^{-1} – deformação axial C–O (éter).

Figura 25. Espectros de infravermelho dos polímeros, a) PMVE-AM antes da funcionalização (em preto); e b) PMVEAIM após a funcionalização (em vermelho).



Os espectros de RMN ^1H do PMVE-AM (Figura 26) e do PMVEAIM (Figura 27) confirmam a funcionalização do PMVE-AM com grupos APIM para a formação do

PMVEAIM. O aparecimento de sinais na região aromática (entre 7,0 e 9,0 ppm), ausentes no espectro do polímero de partida, reforçam a entrada do APIM na estrutura polimérica, uma vez que os sinais presentes em 8,68, 7,43 e 7,35 ppm são referentes aos hidrogênios do anel aromático do imidazol. No espectro do PMVE-AM, observa-se o aparecimento de um sinal com deslocamento químico entre 2,0 – 2,5 ppm referente aos hidrogênios do grupo CH₂ da cadeia principal do polímero (“d”). Entre 2,5 – 3,3 ppm encontram-se os sinais referentes aos grupos CH ligados às carboxilas do anidrido (“a” e “b”) e ao éter (“c”). Em 3,5 ppm encontra-se o sinal referente ao grupo CH₃ do éter (“d”). Os sinais atribuídos são semelhantes aos previamente relatados para o polímero comercial PMVE-AM e para estruturas semelhantes.^{123,125} É possível perceber, também, sinais com deslocamentos químicos entre 3,5 – 4,5 ppm que podem ser referentes aos hidrogênios de grupos CH ligados diretamente às carbonilas dos ácidos carboxílicos provenientes da ruptura do anel do anidrido maleico de monômeros que sofreram hidrólise anteriormente à reação de funcionalização.¹⁴⁰ Esses monômeros não formam ligação amida com os grupos APIM, permanecendo, portanto, como monômeros não funcionalizados.

No espectro do PMVEAIM (**Figura 27**), observa-se sinais com deslocamento químico entre 1,5 – 2,3 ppm correspondentes aos hidrogênios presentes nos grupos CH₂ isolados presentes na cadeia principal do polímero (“d”) e no APIM (“g”). Os sinais sobrepostos entre 2,5 – 4,0 ppm são atribuídos aos hidrogênios presentes nos grupos CH₃ ligado ao éter (“e”), aos hidrogênios dos grupos CH ligados ao éter (“c”) e às carbonilas provenientes da clivagem do anel do anidrido maleico (“a” e “b”) e, também aos hidrogênios do grupo CH₂ ligado ao nitrogênio que compõe a amida (“f”). O sinal em 4,18 ppm é referente ao grupo CH₂ ligado à estrutura do imidazol (“h”). Os sinais aparentes na região aromática (7,35, 7,43 e 8,68 ppm) são atribuídos aos hidrogênios dos grupos CH do imidazol (“i”, “j” e “k”), sendo o hidrogênio “k” com maior deslocamento químico pois o grupo CH em que se encontra está diretamente ligado a dois átomos de nitrogênio.

Figura 26. Espectro de RMN do polímero comercial PMVE-AM em acetona- d^6 .

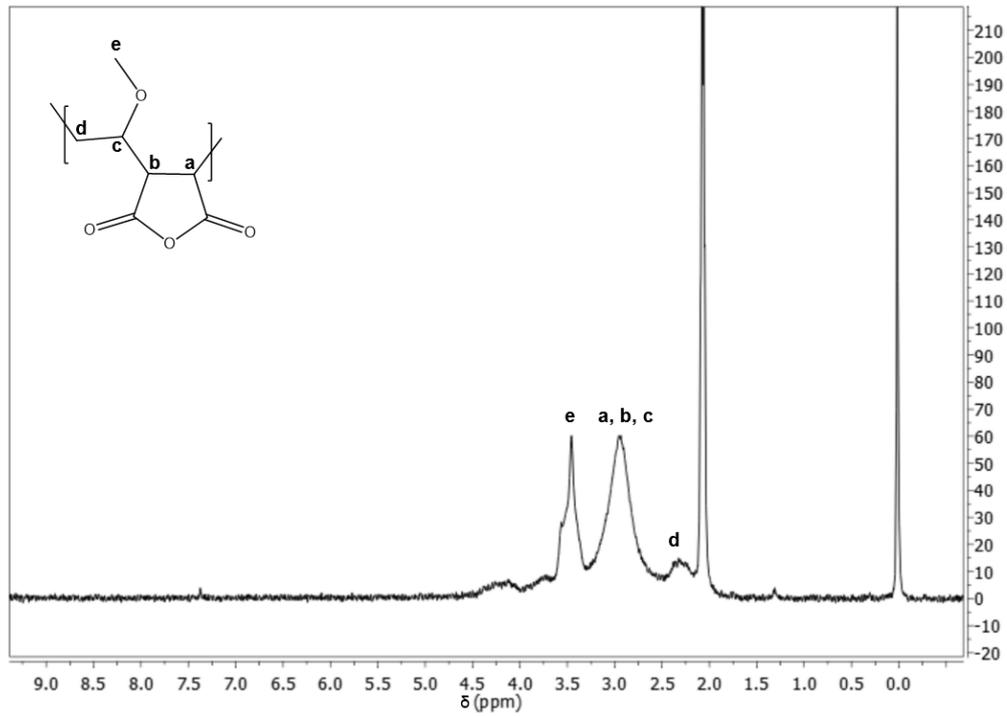
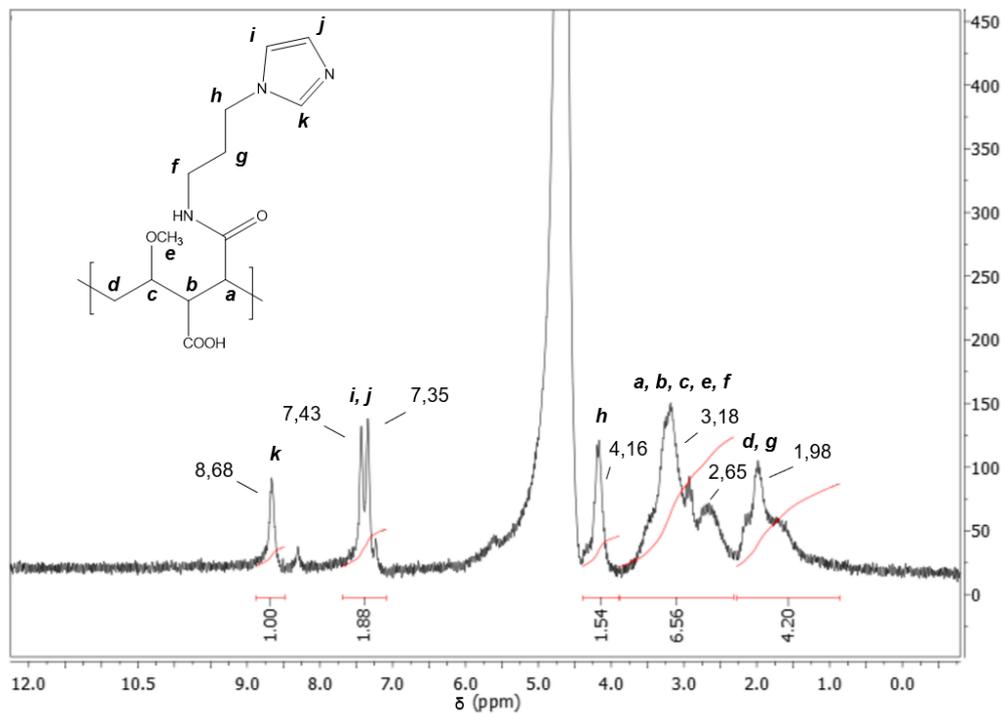


Figura 27. Espectro de ^1H RMN para o PMVEAIM em D_2O



5.2.1 Análise elementar (CHN)

A análise elementar foi realizada para determinar as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio que compõem os polímeros PMVE-AM e PMVEAIM. Os valores experimentais e os teóricos, calculados a partir dos monômeros dos polímeros, são apresentados na **Tabela 4**. Para o polímero PMVE-AM a quantidade de carbono medida é um pouco menor do que o valor esperado, enquanto a quantidade de hidrogênio é maior do que o esperado, o que pode ser relacionado à presença de água adsorvida no polímero. Para o PMVEAIM observa-se que a porcentagem de hidrogênio medida é maior do que a calculada, enquanto as porcentagens de carbono e nitrogênio estão abaixo do esperado. Esses resultados podem ser explicados pela presença de água adsorvida no polímero, e pela hidrólise de parte do anidrido maleico anteriormente à reação de funcionalização, resultando na presença de ácidos carboxílicos vicinais na cadeia polimérica. Esses ácidos carboxílicos vicinais influenciam nas diferenças observadas também para o polímero funcionalizado, pois nessas regiões não há a formação da amida e a entrada do APIM na estrutura do polímero, de modo que há menor quantidade de APIM incorporada ao polímero do que o esperado.

Tabela 4. Análise de CHN (em %) dos polímeros PMVE-AM e PMVEAIM. Os valores com asterisco foram calculados a partir da fórmula molecular dos monômeros.

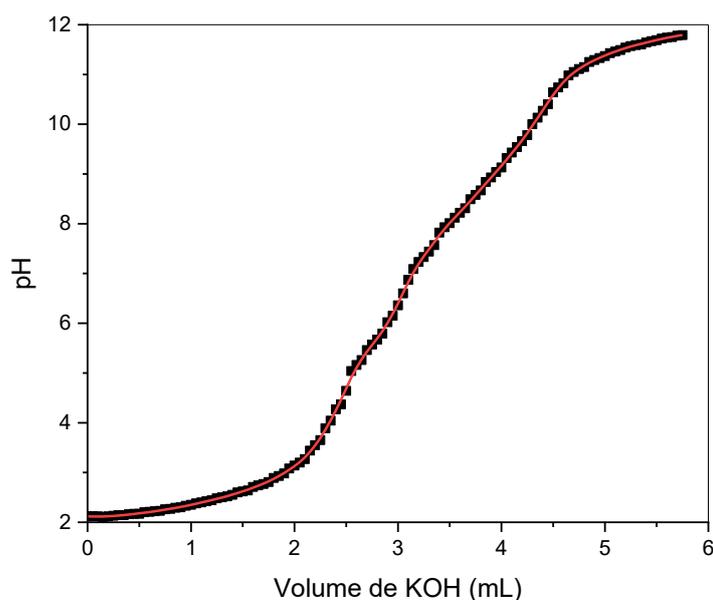
| Polímero | C | H | N |
|----------|--------|-------|--------|
| PMVEA | 50,58 | 5,49 | 0,07 |
| | 53,85* | 5,13* | 0,00* |
| PMVEAIM | 47,34 | 7,03 | 12,20 |
| | 55,71* | 6,72* | 15,00* |

5.2.2 Titulação potenciométrica do polímero funcionalizado PMVEAIM

A titulação potenciométrica do PMVEAIM com KOH foi realizada para a determinação dos valores de pK_a do polímero. Os valores de pK_a foram obtidos a partir da curva de titulação apresentada na **Figura 28**, com o auxílio do programa CurTiPot. Os valores de pK_a encontrados foram 2,5, 5,57, 7,8 e 9,3. Os valores de pK_a de 2,5 e 5,57 foram atribuídos à ionização do ácido carboxílico, enquanto os valores de pK_a de 7,8 e 9,3 foram atribuídos ao imidazol. No que se refere ao pK_a do carboxilato isolado, por exemplo, o ácido acético tem o pK_a de 4,75. ¹⁴¹ Os dois valores de pK_a encontrados nesse trabalho assemelham-se aos

observados para o ácido maleico, e são explicados neste trabalho pela proximidade dos grupos ácidos carboxílicos, resultando em interações intra e intermolecular, resultante do emaranhamento das cadeias do polímero de alta massa molar. A diminuição do pKa do grupo ácido carboxílico, em relação ao grupo livre, deve-se à estabilização da base conjugada, que faz ligações hidrogênio com um ácido carboxílico protonado. Após a formação dessa ligação hidrogênio, a abstração do hidrogênio que faz parte dessa interação é dificultada, resultando na menor acidez e maior pKa, em relação ao grupo isolado.^{142,143} Além disso, os valores de pKa para o imidazol foram de 7,8 e 9,3, valores maiores do que para o imidazol livre de 6,97, o que também pode ser por interações específicas em diferentes microambientes formados na matriz polimérica.

Figura 28. Titulação potenciométrica do polímero PMVEAIM ($6,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com o titulante KOH ($0,097 \text{ mol L}^{-1}$).



A partir da curva potenciométrica e dos valores de pKa, é possível determinar a quantidade de mols do titulante necessária para ionização dos grupos carboxilato e imidazol. A partir da titulação potenciométrica também foi possível estimar a proporção carboxilato/imidazol de 0,44. A maior quantidade de carboxilato encontrada possibilita estimar a porcentagem de anidrido hidrolisado antes da reação de 11%.

Além disso, foi possível avaliar a quantidade das espécies ionizadas do PMVEAIM (**Esquema 2**) em função do pH do meio, **Figura 29**. Sendo assim, é possível determinar que,

em pH 3, há 26% da espécie E1 e 74% da espécie E2; em pH 6, há 22% da espécie E2, e 76% da espécie E3; em pH 7, há 73% de E3 e 24% de E4; e, em pH 9, há 42% de E4 e 57% de E5.

Esquema 2. Espécies de PMVEAIM em função do pH.

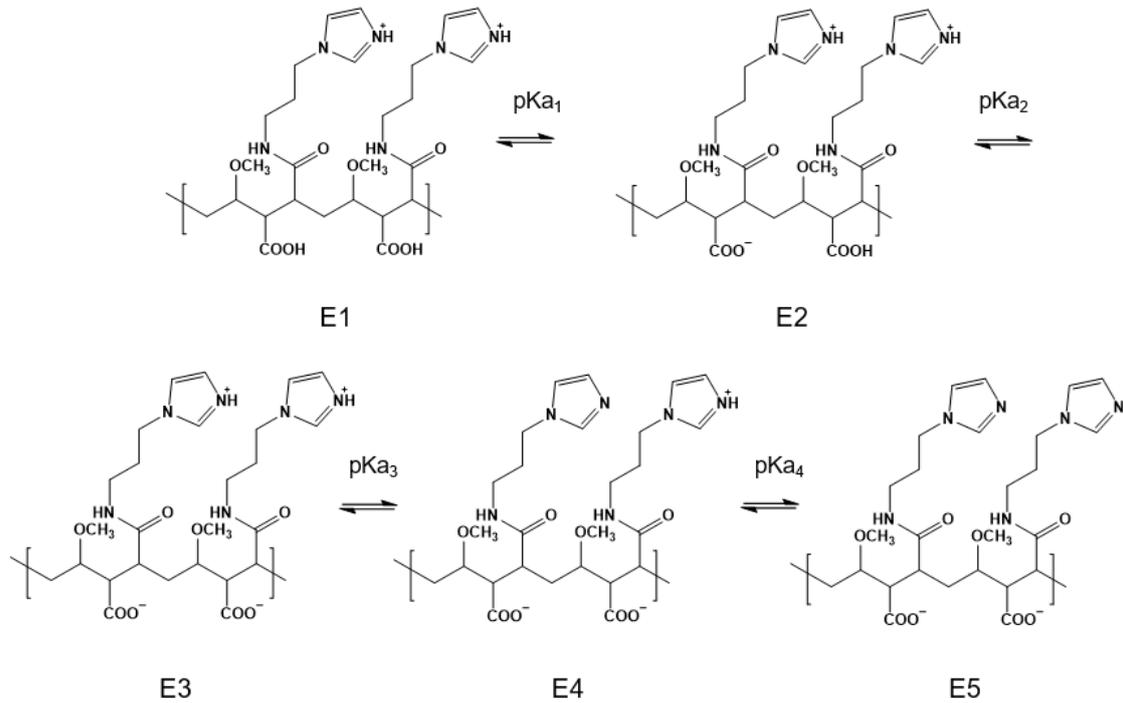
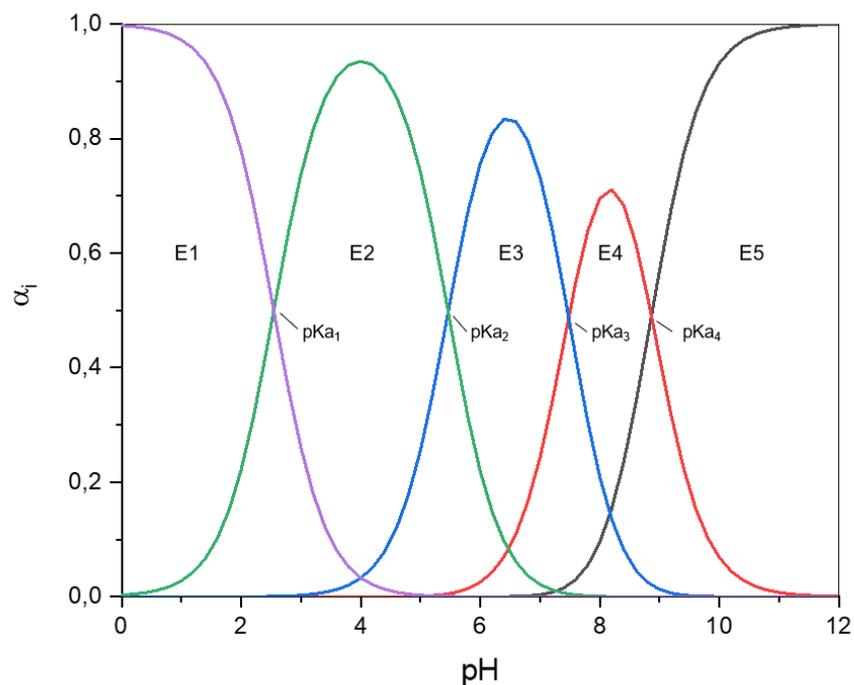


Figura 29. Distribuição (em %) das espécies de PMVEAIM em função do pH.

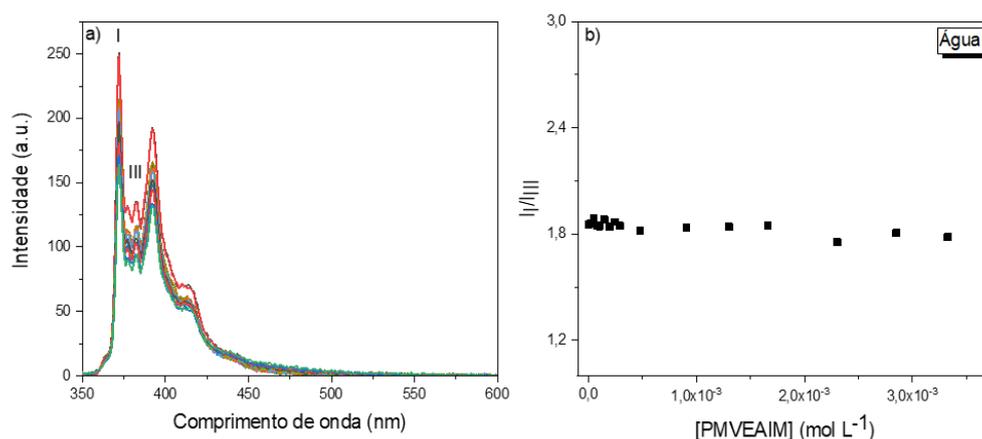


5.3 ESTUDO DA AUTO-ORGANIZAÇÃO DO PMVEAIM (SEM E COM SURFACTANTE)

5.3.1 Avaliação da formação de microambientes através do pireno como sonda fluorescente de polaridade

Estudos sobre a auto-organização do polímero PMVEAIM, primeiramente na ausência do surfactante, foram realizados utilizando o pireno como sonda fluorescente. Os espectros de emissão de fluorescência do pireno em sistema aquoso contendo diferentes concentrações de PMVEAIM podem ser observados na **Figura 30a**. A **Figura 30b** apresenta a razão das intensidades das bandas I e III do pireno, que pode ser utilizada para avaliar a formação de microambientes com diferentes polaridades. Em solventes polares, como água, o valor da razão esperado é aproximadamente 2, enquanto que para solventes apolares, como o hexano, o valor esperado é 0,6.¹²¹ Nesse trabalho, com o aumento da concentração de polímero a razão I_I/I_{III} permaneceu em torno de 1,8, indicando a ausência de microambientes hidrofóbicos na concentração de polímero avaliada. Isso está em concordância com as espécies do polímero esperadas em água (pH próximo a 5,5), onde se tem essencialmente as espécies E2 e E3, altamente ionizadas e polares, e nesse caso mesmo com a formação de agregados auto-organizados não há a formação de microambientes apolares.

Figura 30. a) Espectros de emissão de fluorescência do pireno em função da concentração de PMVEAIM em água; b) Gráficos da razão das intensidades das bandas vibrônicas I e III (I_I/I_{III}) do espectro de fluorescência do pireno em função da concentração de PMVEAIM.



A fim de solubilizar a curcumina, molécula hidrofóbica, em sistemas de liberação pH-responsivos buscou-se a complexação do PMVEAIM com surfactante catiônico.

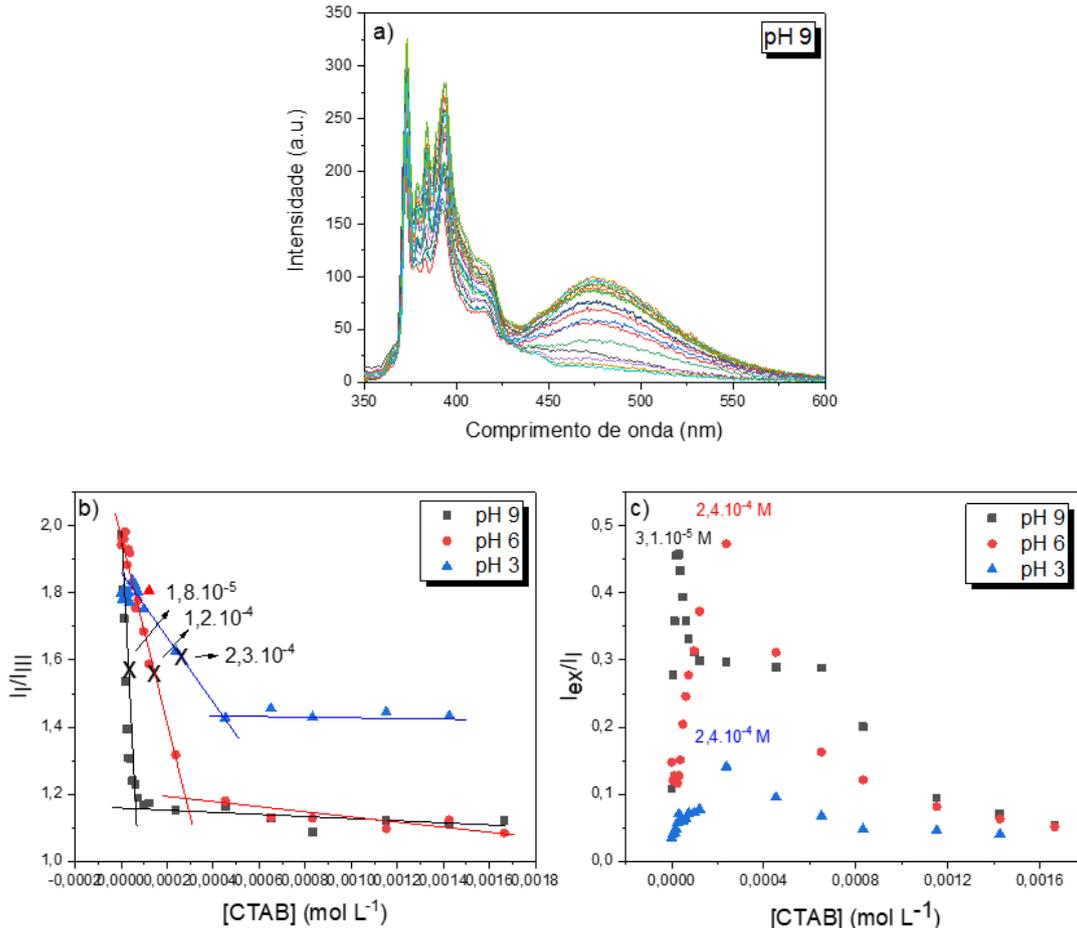
5.3.2 Complexos supramoleculares do polímero PMVEAIM e do surfactante cetiltrimetilamônio (CTAB)

A formação de complexos supramoleculares polímero/surfactante foram avaliados em função da concentração de surfactante catiônico em diferentes pHs. Os espectros de emissão do pireno, na presença de PMVEAIM e diferentes concentrações de CTAB em pH 9, são mostrados na **Figura 31a**. Com o aumento da concentração de surfactante houve um aumento da intensidade da banda III e da banda larga de excímero na região de 450-550 nm, não observada na ausência de surfactante. Essa banda é relacionada a um dímero de pireno envolvendo uma molécula no estado fundamental e outra no estado excitado, e ocorre em altas concentrações do fluoróforo. A concentração de pireno utilizada está abaixo da concentração necessária para a formação de excímero, contudo com a formação de microambientes hidrofóbicos, tem-se a partição de moléculas de pireno para essas regiões, levando a uma alta concentração local de pireno, observando-se assim a banda de excímero. Com o aumento da concentração de surfactante, e conseqüente aumento das microrregiões hidrofóbicas tem-se a diluição do polímero e a diminuição da banda de emissão do excímero.

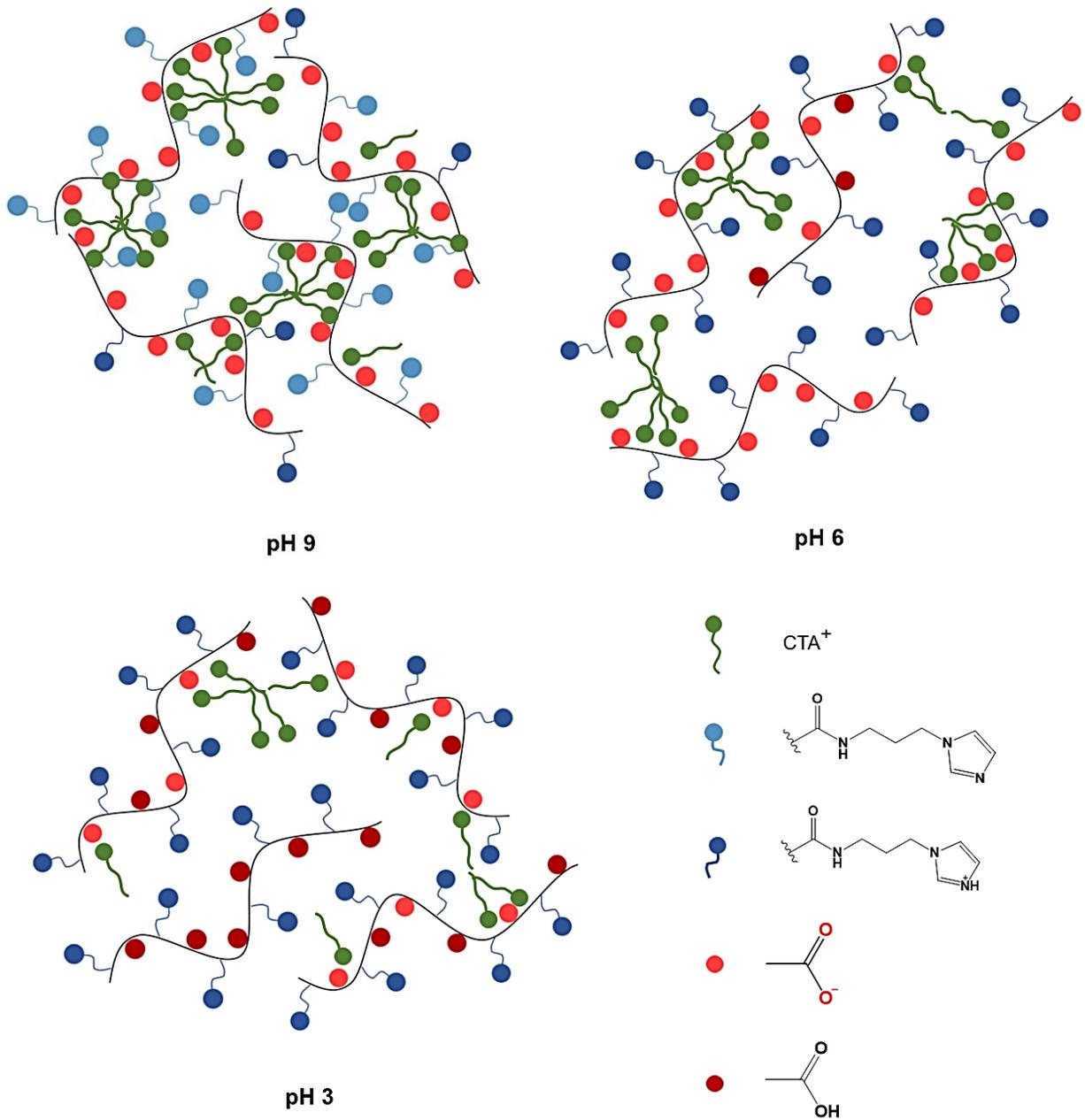
A fim de avaliar a formação de microambientes com diferentes polaridades em diferentes pH, obteve-se a razão das bandas I_I/I_{III} em função da concentração de CTAB (**Figura 31b**). Em pH 9, observou-se uma diminuição intensa da razão I_I/I_{III} com a adição de surfactante. O valor da concentração agregacional crítica (cac) em pH 9 foi de $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (**Tabela 5**), bem abaixo da cmc do CTAB de aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.¹⁴⁴ Para o sistema contendo polímero em pH 9, tem-se as espécies E4 e E5, com grupos carboxilatos ionizados e capazes de interagir eletrostaticamente com o grupo trimetilamônio. Essas interações associadas com as interações hidrofóbicas resultam na formação de microambientes hidrofóbicos, mesmo abaixo da cmc do surfactante (**Esquema 3**). Para $[\text{CTAB}] > \text{cac}$ a razão I_I/I_{III} foi próxima a 1,1, indicando uma micropolaridade similar à do etanol.¹²¹ Em pH 6, a razão I_I/I_{III} mostrou um perfil similar ao pH 9, com cac de $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. No pH 6, a espécie 3 com carboxilatos desprotonados e imidazóis protonados prevalece. Uma vez que apenas 44% dos grupos funcionalizados são constituídos de imidazol e 66% de carboxilatos, tem-se um excesso de carga negativa no polímero que pode levar a formação dos complexos em decorrência de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A micropolaridade do complexo avaliada pela razão I_I/I_{III} de aproximadamente 1,1 mostram a similaridade dos microambientes em pH 6 e 9. Em pH 3, onde se tem principalmente a espécie E2, a formação de complexos é desfavorecida e a cac aumenta para $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, após a formação dos complexos

supramoleculares a razão das bandas $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ foi de aproximadamente 1,45, indicando um microambiente mais polar em relação aos pHs 6 e 9. Isso porque, em pH 3 a grande quantidade de grupos protonados deve levar a formação de microambientes com maior quantidade de água, e conseqüentemente mais polares.

Figura 31. a) Espectros de emissão de fluorescência do pireno na presença de PMVEAIM ($9,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função da concentração de CTAB em pH 9; b) $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ em função de [CTAB]; e c) $I_{\text{ex}}/I_{\text{I}}$ em função de [CTAB].



Esquema 3. Representação esquemática de complexos PMVEAIM/CTAB em diferentes pH.



A partir dos gráficos de I_I/I_{III} em diferentes concentrações de surfactante, e com o auxílio da equação 5, foi possível obter valores das constantes de associação (k_b) entre o polímero e o CTAB, apresentados na **Tabela 5**. Na equação 5, F é a intensidade de fluorescência em cada concentração de CTAB ($[CTAB]$), e F_0 e F_f são as intensidades de emissão na ausência do surfactante e após a ligação, respectivamente. Os valores de K_b foram altamente dependentes

do pH, seguindo a ordem: pH 9 >> pH 6 > pH 3. Essa tendência pode ser explicada pelo aumento de carboxilatos ionizados, livres, capazes de interagir eletrostaticamente com o CTA⁺.

$$F = \frac{(F_0 + (F_f \cdot K_b \cdot [CTAB]))}{1 + (K_b \cdot [CTAB])} \quad (5)$$

Tabela 5. Valores das concentrações agregacionais críticas (cac) e de constantes de ligação (Kb) para PMVEAIM/CTAB em pH 3, 6 e 9.

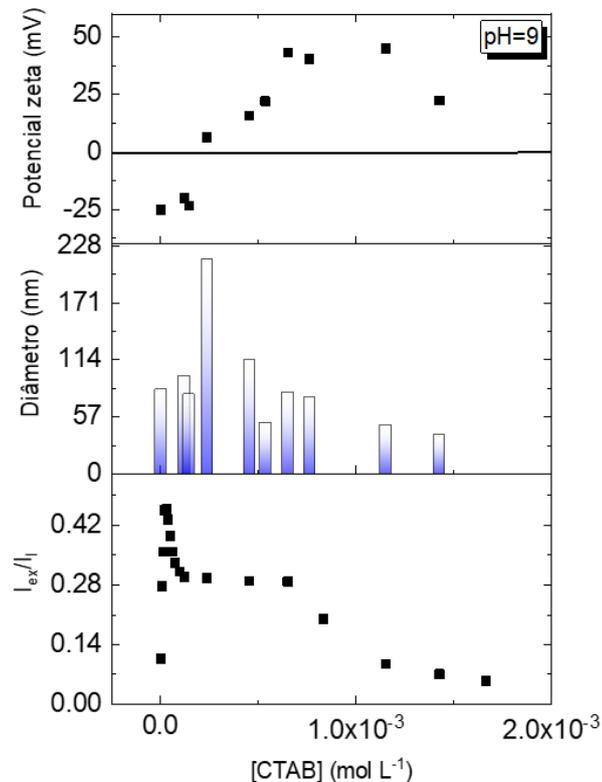
| pH | cac (10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) | K _b (10 ³ L mol ⁻¹) |
|----|---|---|
| 9 | 0,18 | 69 ± 1,1 |
| 6 | 1,2 | 5,4 ± 0,8 |
| 3 | 2,3 | 1,7 ± 0,8 |

Adicionalmente, avaliou-se a razão das intensidades das bandas de excímero pela banda de monômero do pireno (I_{ex}/I_l) em diferentes [CTAB] (**Figura 31.c**). Com o aumento da concentração de surfactante houve um grande aumento da razão I_{ex}/I_l até se atingir um máximo, normalmente encontrado próximo a cac. Isso acontece porque a formação dos complexos com microambiente hidrofóbicos possibilita a partição do pireno para essas microrregiões, levando a uma elevada concentração microlocal do pireno, possibilitando a formação de excímeros. Com o aumento posterior da concentração de surfactante há a formação de maior número de microrregiões hidrofóbicas e micelas, possibilitando a diluição do pireno nestas microrregiões, e conseqüentemente diminuindo a formação de excímero.

5.3.3 Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das partículas de PMVEAIM/CTAB

O tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta das partículas de PMVEAIM/CTAB foram medidos em função da concentração de CTAB presente em diferentes pH (3, 6 e 9). Em pH 9 e ausência de surfactante, observou-se a formação de partículas de aproximadamente 85 nm e potencial zeta de - 25 mV. Nesse pH tem-se uma mistura das espécies E4 (parte do imidazol protonado) e E5 (imidazol totalmente desprotonado), e o íon imidazólio pode formar complexos eletrostáticos com grupos carboxilatos, nesse caso observaram-se partículas de 85 nm. Ainda nesse pH o excesso de carboxilato desprotonado justifica o potencial zeta negativo das partículas. Com o aumento da concentração de CTAB há um aumento do potencial zeta, passando por zero, e atingindo um máximo de aproximadamente +45 mV. Quando o potencial zeta do agregado passa por zero, têm-se partículas maiores de 220 nm.

Figura 32. Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e razão I_{ex}/I_l das partículas em função da concentração de CTAB em pH 9. $[PMVEAIM]=1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

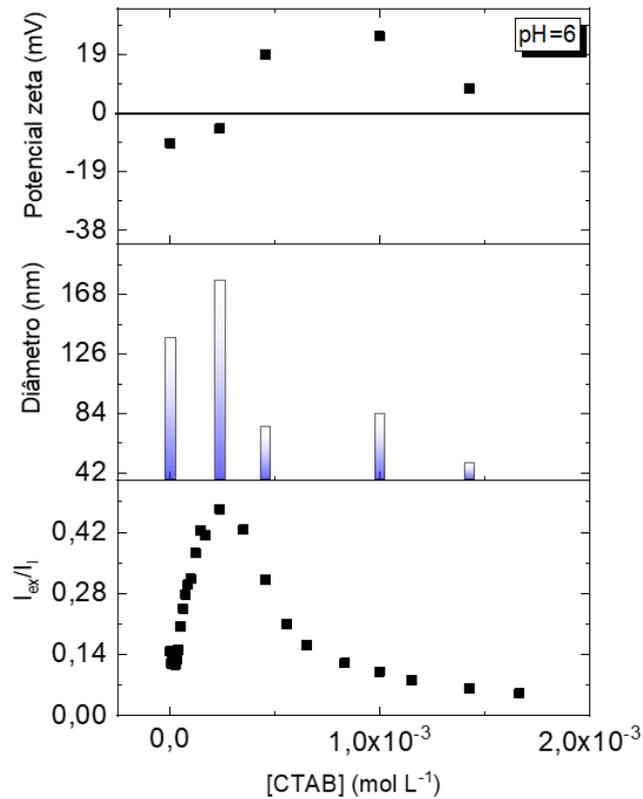


A **Figura 32**, mostra o comportamento da intensidade de emissão de excímero do pireno em relação a banda de monômero, que pode ser relacionada com as medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos complexos. Por exemplo, na ausência de surfactante, as partículas formadas de 85 nm e potencial zeta não apresentam microdomínios hidrofóbicos e não há a formação de excímero. Após a cac e formação de microrregiões hidrofóbicas, onde se tem a máxima formação de excímero, o potencial zeta aumenta ligeiramente, mas segue negativo, até a região do ponto isoelétrico. Nessa região observa-se um platô na curva de I_{Ex}/I_M até a cmc do surfactante.

Em pH 6 e ausência de surfactante, as partículas de PMVEAIM apresentaram diâmetro de 130 nm e potencial zeta de -10 mV. Nesse pH tem-se a presença da espécie E2 e principalmente da espécie E3, com pequeno excesso de cargas negativas na estrutura polimérica, justificando a menor intensidade da carga negativa e consequente o maior tamanho da partícula. Assim como aconteceu em pH 9, aumentando a concentração de CTAB houve um aumento do potencial zeta, passando pelo ponto isoelétrico, até se atingir um platô de +20 mV. O tamanho do complexo polímero/surfactante foi de 170 nm no ponto isoelétrico, e diminuiu

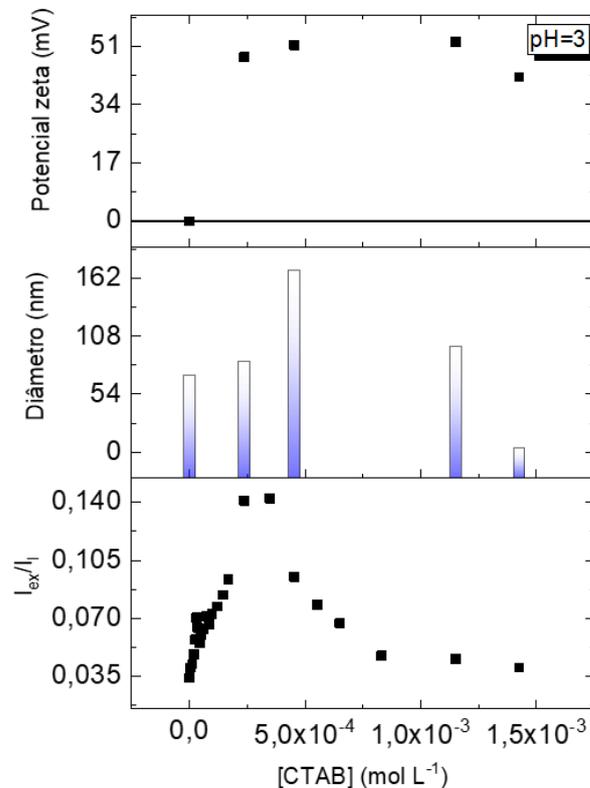
com o aumento do potencial zeta. Em pH 6, o ponto isoelétrico foi coincidente com o máximo da razão I_{EXC}/I_M .

Figura 33. Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e razão I_{ex}/I_l das partículas em função da concentração de surfactante em pH 6. $[PMVEAIM]=1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Em adição, em pH 3, onde há a espécie E1 e principalmente a E3 do PMVEAIM, o tamanho da partícula foi de 140 nm e o potencial zeta de zero na ausência de surfactante (**Figura 34**). O potencial zeta de zero indica que nesse pH o número de grupos imidazóis protonados é igual ao número de carboxilatos desprotonados. Após a adição de CTAB, observa-se o aumento do potencial zeta para + 50 mV e partículas com tamanho entre 50 e 200 nm.

Figura 34. Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e razão I_{ex}/I_l das partículas em função da concentração de surfactante em pH 3. $[PMVEAIM] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



As razões I_{EXC}/I_M apresentadas nas Figuras 32, 33 e 34, e a relação dessa razão com propriedades do complexo como tamanho e potencial zeta mostra uma grande dependência com o pH do meio. Sendo que em pH 9 o máximo da I_{EXC}/I_M é observado abaixo do ponto isoelétrico, em pH 6 no ponto isoelétrico e em pH 3 em partículas com potencial zeta positivo. Como mostrado no esquema 3, o pH do meio e as diferentes espécies de polímero presente influenciam tanto a carga superficial do complexo pela diferença da quantidade de grupos ionizáveis, como a formação de microdomínios hidrofóbicos.

5.4 OBTENÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOPARTICULADOS BASEADOS EM COMPLEXOS POLÍMERO/SURFACTANTE

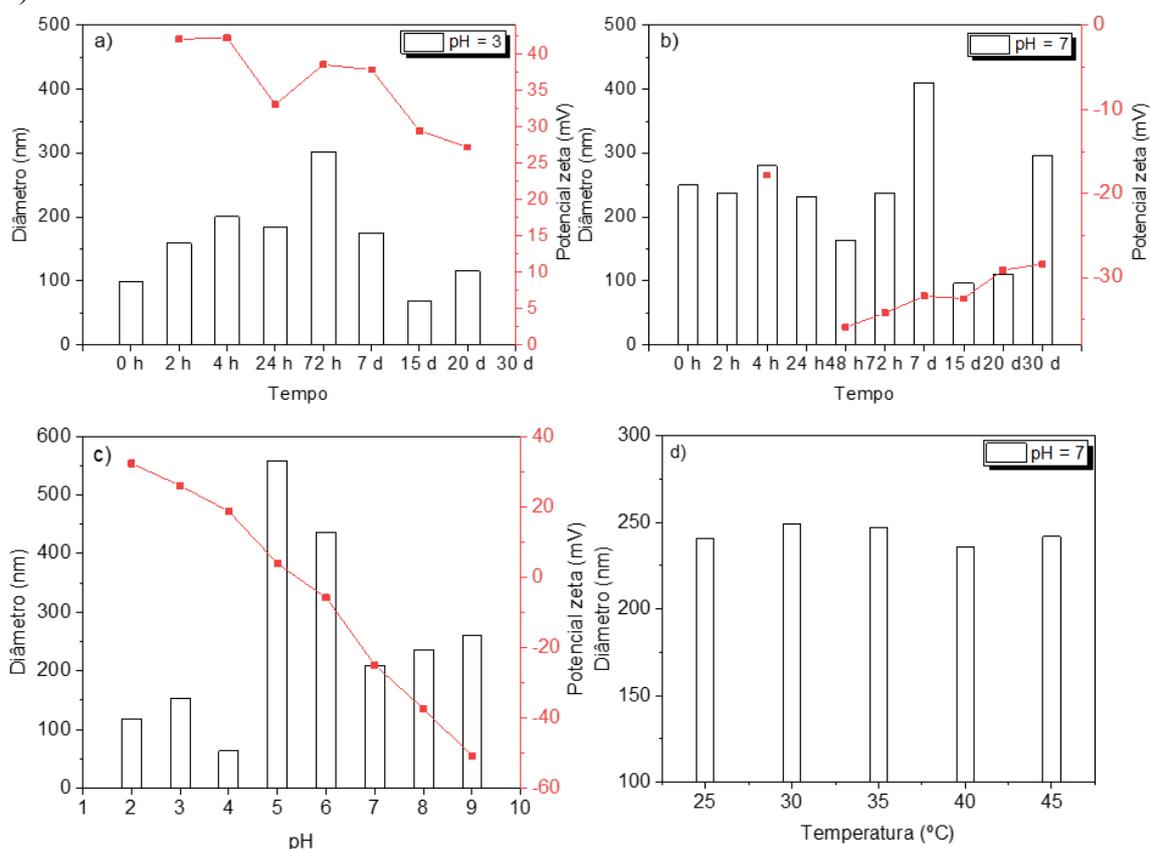
5.4.1 Sistemas de liberação nanoestruturados na ausência de curcumina

Sistemas nanoparticulados de polímero/surfactante foram obtidos na ausência de curcumina para comparação. As partículas obtidas foram caracterizadas quanto ao tamanho hidrodinâmico e potencial zeta em pH 3 e 7, as medidas foram acompanhadas durante 30 dias.

Os tamanhos das partículas, em função do tempo, apresentaram-se relativamente estáveis, entre 100 – 300 nm, em pH 3 e 7 (**Figuras 35a e 35b**). O potencial zeta, em pH 3 medido inicialmente foi de +40 mV e diminui até +27 mV com o tempo. Essa alteração pode indicar a alteração da organização das moléculas nas partículas. Ainda assim, o potencial zeta continuou positivo e a estabilidade da partícula foi mantida. Por outro lado, em pH 7, o potencial zeta das partículas foram negativas e variaram entre -20 e -40 mV.

O tamanho e o potencial zeta das partículas foram acompanhados em função do pH (**Figura 35c**), e observou-se que em $\text{pH} < 4$ o tamanho hidrodinâmico das partículas estavam entre 100 e 200 nm, enquanto o potencial zeta foi positivo e diminui com o aumento do pH. O potencial zeta de zero foi observado entre 5 e 6, e nesse caso o tamanho das partículas aumentou drasticamente. Em $\text{pH} > 7$, o potencial zeta foi negativo e o tamanho hidrodinâmico das partículas ficou entre 200 e 300 nm. O potencial zeta negativo em pH 7, deve-se ao fato de se ter um excesso de carboxilato em relação ao CTAB, enquanto em pH ácido parte do carboxilato está protonado e os agregados possuem excesso de carga positiva.

Figura 35. Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta das partículas de polímero/surfactante em função: a) do tempo, em pH 3, a 25 °C; b) do tempo, em pH 7, a 25 °C; c) do pH do meio, a 25 °C; e d) da temperatura, em pH 7. ($[\text{PMVEAIM}] = 4,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CTAB}] = 4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

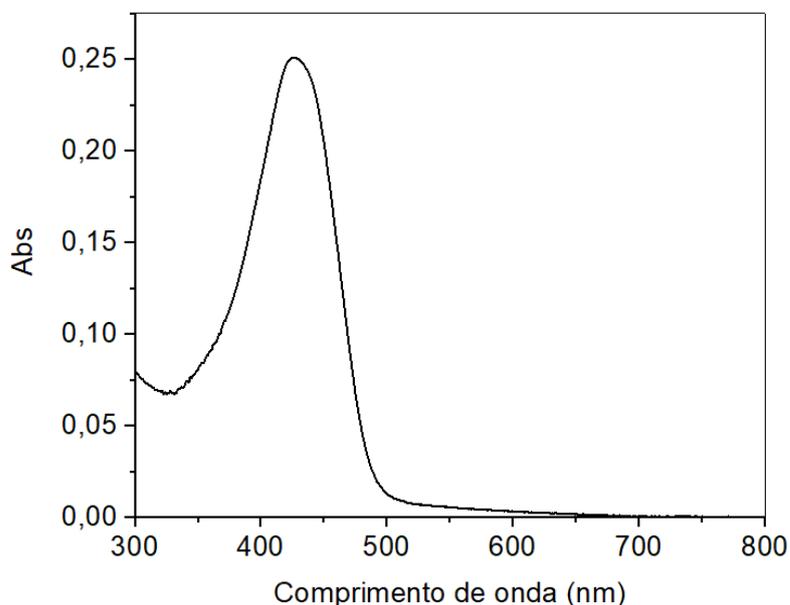


As partículas não apresentaram grande diferença de tamanho com a variação da temperatura na região de 25 a 45 °C (**Figura 35d**). Os tamanhos médios se mantiveram próximos de 250 nm. O potencial zeta, portanto, foi medido apenas em temperatura 25 °C e o valor medido foi -22,80 mV.

5.4.2 Sistemas de liberação nanoestruturados após a incorporação de curcumina

A quantidade de curcumina incorporada nas nanopartículas foi determinada a partir da equação de Lambert-Beer (1) e do espectro de absorção da curcumina incorporada no formulado e diluída em etanol, **Figura 36**. Uma alíquota de 20 µL do formulado foi adicionada a 2 mL de etanol, resultando em uma porcentagem de água na solução de 1%. Utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar da curcumina em etanol de $53,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 424 \text{ nm}$), para determinar a concentração de curcumina na solução etanólica de $4,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o que possibilita determinar a concentração de curcumina no formulado de $4,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o que correspondente a 34,5% do total de curcumina utilizada no processo de encapsulamento.

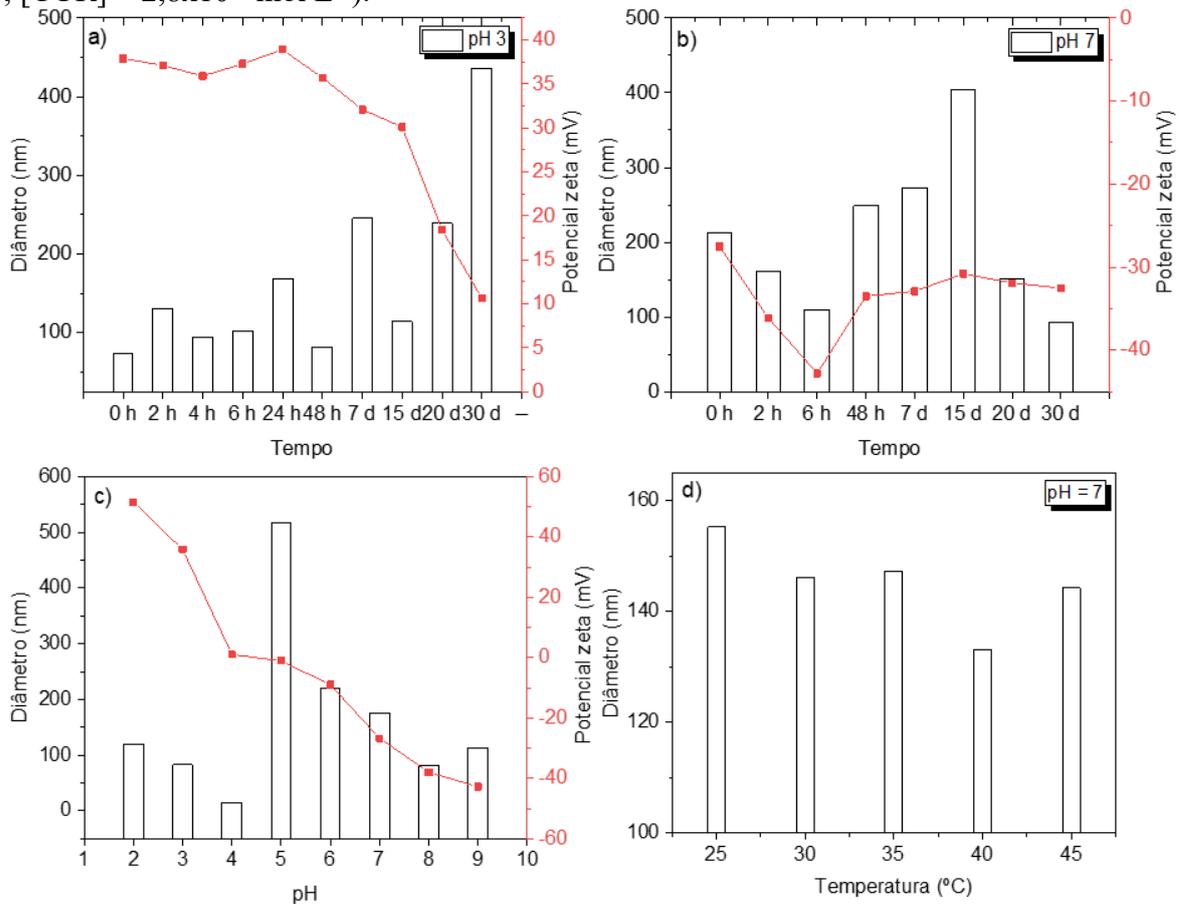
Figura 36. Espectro de absorção da curcumina ($1,36 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) incorporada no formulado utilizando etanol como solvente.



Os sistemas de liberação contendo curcumina foram caracterizados com relação ao tamanho hidrodinâmico e potencial zeta (**Figura 36**). Para os formulados contendo curcumina, em pH 3 (**Figura 36a**), no tempo inicial as partículas apresentam potencial zeta de + 40 mV e diâmetro de 85 nm. Com o tempo observou-se a variação do tamanho entre 100 – 300 nm e a

diminuição do potencial zeta. Após 30 dias de análise o potencial zeta foi de aproximadamente zero, e o tamanho da partícula maior de 400 nm. Já no pH 7 (**Figura 36b**), no tempo inicial o tamanho das partículas foi de 200 nm, enquanto o potencial zeta foi de -30 mV. Durante os 30 dias o potencial zeta variou entre -30 e -40 mV, enquanto o tamanho manteve-se entre 200 e 400 nm.

Figura 37. Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta dos formulados contendo curcumina em função: a) do tempo, em pH 3, a 25 °C; b) do tempo, em pH 7, a 25 °C; c) do pH do meio, a 25 °C; e d) da temperatura, em pH 7. ([PMVEAIM] = $4,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; [CTAB] = $4,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; [CUR] = $2,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).



Como pode ser visto na **Figura 37c**, o tamanho das partículas em função do pH apresentou tamanho maior em pH 5, quando o potencial zeta encontrava-se próximo de zero, assim como observado anteriormente na ausência de curcumina. Em adição, as partículas não apresentaram grandes variações de tamanhos em função da temperatura (**Figura 37d**), e o potencial zeta medido a 25 °C foi -23,3 mV.

5.5 ESTABILIDADE DA CURCUMINA LIVRE E ENCAPSULADA NOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

A estabilidade da curcumina é um desafio para as suas aplicações principalmente em pH neutro ou alcalino. Estudos prévios, reportados por Wang *et al.*, indicam que a curcumina apresenta menor taxa de degradação em ambiente ácido. Isso ocorre porque, nessas condições, as moléculas se apresentam na forma dicetona, e em razão disso se comportam como potentes doadores de prótons.¹⁴⁵ Já em ambientes alcalinos, apesar de possuir uma solubilidade maior do que em meio aquoso devido às desprotonações das hidroxilas presentes em sua estrutura, a curcumina sofre hidrólise pelos íons OH⁻ presentes em solução, formando maior quantidade produtos de degradação, conforme discutido na revisão bibliográfica.³⁶

As cinéticas de degradação da curcumina foi acompanhada via espectrofotometria UV-visível em função do tempo, em suas formas livre e encapsulada em nanopartículas do formulado PMVEAIM/CTAB, em diferentes condições de pH (3, 7 e 9) e 25 °C. Em pH 3, a curcumina degradou-se completamente após 50 horas como pode ser visto na **Figura 38a**. A cinética de degradação seguiu um perfil bem complexo que impossibilitou o ajuste da cinética, possivelmente devido a sobreposição da absorção de reagente e intermediários. Após a incorporação da curcumina no sistema de liberação em pH 3, essa mostrou-se estável durante o tempo analisado (**Figura 38b**). Nesse caso, tem-se o aumento da absorção com o tempo, e a análise dos espectros no tempo inicial e final (**Figura 39**) mostra o desaparecimento da banda presente em $\lambda = 375$ nm, referente à forma dicetona da curcumina³⁵, indicando que houve uma reorganização das moléculas da forma dicetona para a forma ceto-enólica mais estável. Assim, em pH 3, apesar das dificuldades encontradas para o ajuste da cinética pode-se concluir que a incorporação da curcumina no sistema de liberação possibilitou a estabilização desta, e o tautomerismo ceto-enólico pode ser diretamente relacionado a esse efeito. Vale ressaltar que em pH 3, os microambientes dos agregados formados são relativamente polares, e pode-se haver interações específicas nessas condições que favorece o tautômero ceto-enol.

Figura 38. Espectros de absorção e cinéticas da degradação da curcumina em pH 3: a) curcumina livre; b) curcumina encapsulada.

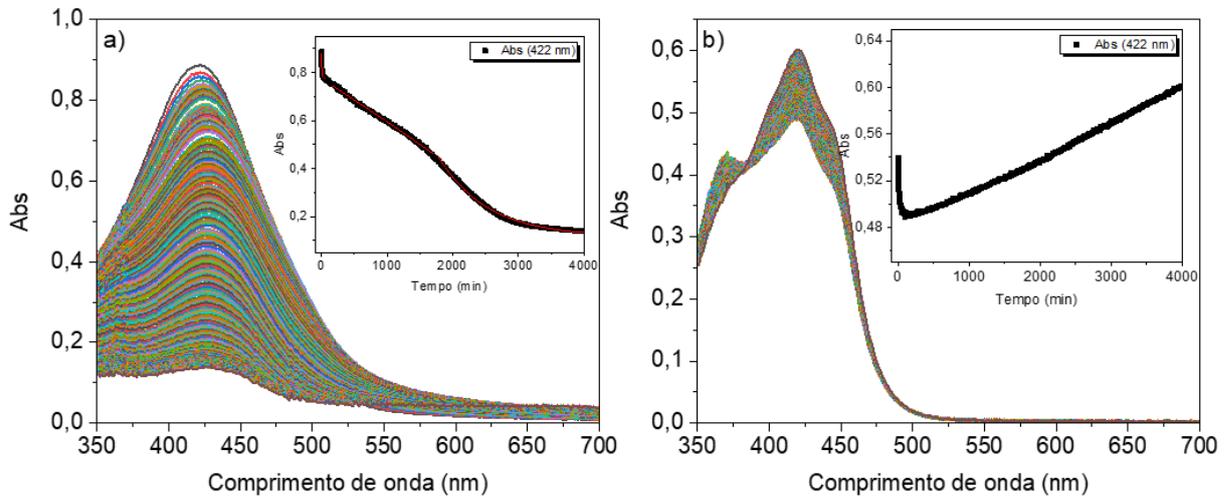
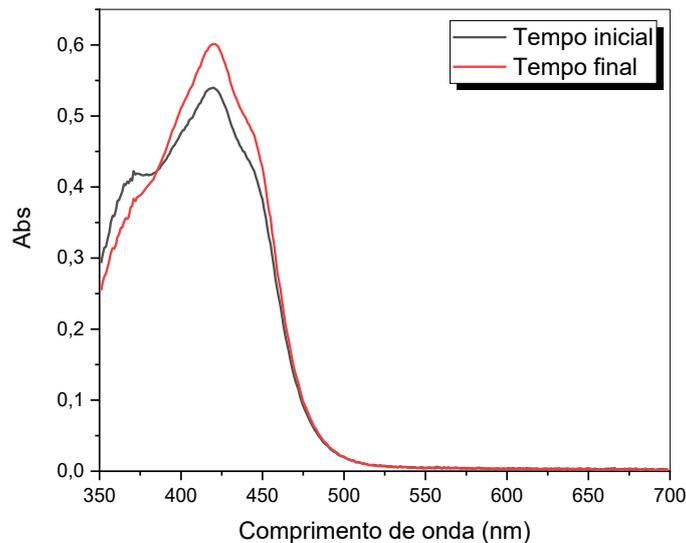


Figura 39. Espectros de absorção da curcumina encapsulada em nanopartículas de PMVEAIM/CTAB em pH 3, nos tempos inicial e final.



A degradação da curcumina livre foi acompanhada em pH 7. Observou-se uma intensa diminuição da intensidade de absorção da curcumina com o tempo (**Figura 40a**). A cinética de degradação foi ajustada a um modelo cinético com duas etapas de 1ª ordem consecutivas. Os valores das constantes de velocidade observadas para as etapas 1 e 2 (k_1 e k_2) são apresentados na **Tabela 6**, e foram de $3,7 \times 10^{-3}$ e $0,51 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. A diminuição da absorção da etapa 1 foi equivalente a diminuição da etapa 2 e corresponde a 41 % da absorção inicial, totalizando uma diminuição da absorção de 82%. Para a curcumina incorporada no sistema de

liberação em pH 7 (**Figura 40b**), houve uma pequena diminuição da intensidade de absorção. Os valores de k_1 e k_2 obtidos nesse caso foram de $9,2 \times 10^{-3}$ e $0,51 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Dessa forma, observou-se que os valores de constantes de velocidade de degradação da curcumina livre e no formulado não foram alteradas em pH 7. Contudo, a diminuição da absorção na etapa 1 e na etapa 2 foi de 7%, totalizando 14%. Em pH 7, espera-se a distribuição da curcumina em diferentes regiões do sistema de liberação, sendo que a porção de curcumina localizada mais externamente teria uma velocidade de degradação próxima a da curcumina livre, enquanto as moléculas incorporadas no interior do complexo permaneceriam estáveis.

Figura 40. Espectros de absorção e cinéticas da degradação da curcumina em pH 7: a) curcumina livre; b) curcumina encapsulada.

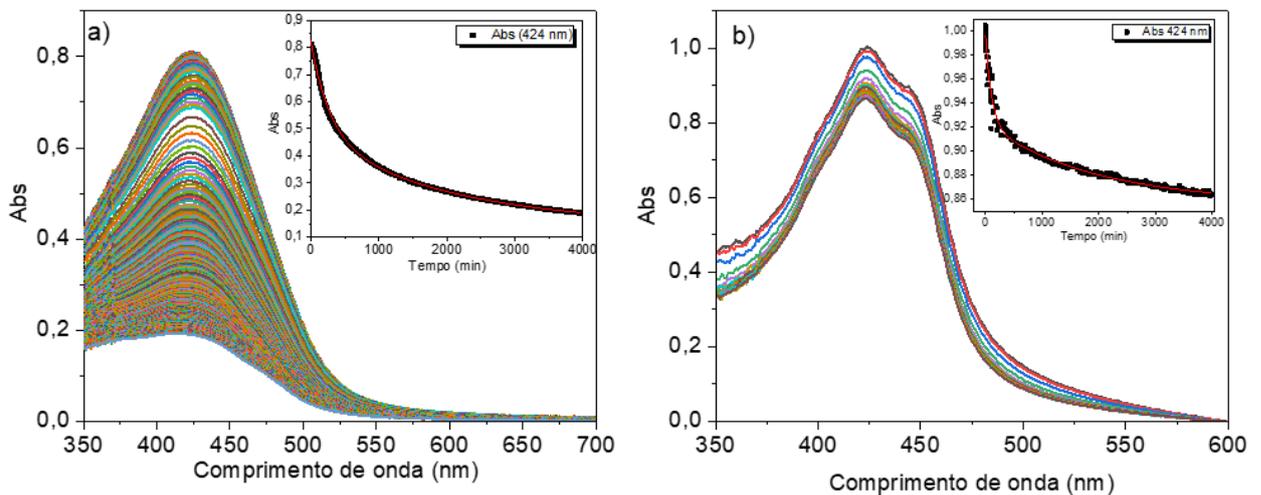


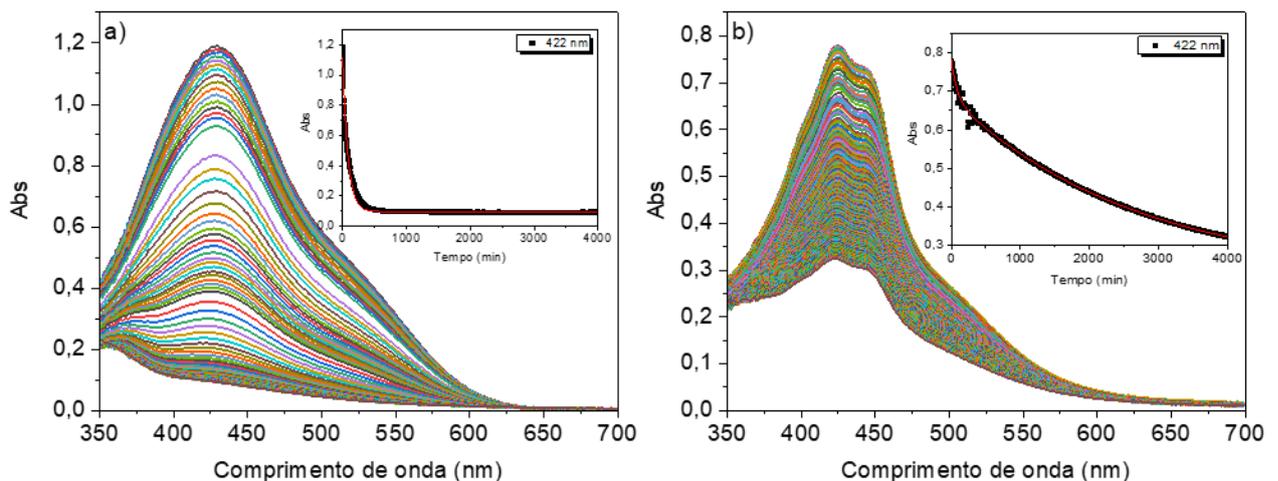
Tabela 6. Constantes de velocidade de degradação da curcumina em diferentes pHs e variação da intensidade de absorção

| | Curcumina livre | | Curcumina encapsulada | |
|-------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|
| | k (10^{-3} min^{-1}) | ΔAbs | k (10^{-3} min^{-1}) | ΔAbs |
| pH 3 | - | | - | |
| pH 7 | k_1 - $3,7 \pm 0,1$ | 41% | k_1 - $9,2 \pm 0,5$ | 7% |
| | k_2 - $0,51 \pm 0,01$ | 41% | k_2 - $0,51 \pm 0,04$ | 7% |
| pH 9 | $12,0 \pm 0,1$ | 83% | k_1 - $11,9 \pm 0,5$ | 12% |
| | | | k_2 - $0,38 \pm 0,01$ | 63% |

Em pH 9, a degradação da curcumina livre aconteceu rapidamente e a cinética ajustou-se a um modelo de 1ª ordem, e o valor da constante de velocidade foi de $12 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, enquanto

a porcentagem de variação da absorção foi de 83%. A cinética de degradação da curcumina no formulado em pH 9 mostrou duas etapas consecutivas, sendo os valores de k_1 e k_2 de $11,9 \times 10^{-3}$ e $0,38 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Sendo que na 1ª etapa a diminuição da absorção foi de 12%, enquanto a da 2ª etapa foi de 63%. A constante de velocidade de degradação da primeira etapa para a curcumina no formulado foi igual a observada para a curcumina livre, e assim como aconteceu no pH 7 espera-se a presença de curcumina na região externa do sistema de liberação. De maneira similar, a etapa 2 seria característica da curcumina presente em regiões mais internas do complexo. É importante mencionar que para as moléculas de curcumina incorporadas no interior do complexo, a velocidade de degradação foi 30 vezes menor do que a curcumina livre, indicando a eficiência do sistema de liberação para a estabilidade da molécula nesse pH.

Figura 41. Espectros de absorção e cinéticas de degradação da curcumina em pH 9: a) curcumina livre; b) curcumina encapsulada.



Apesar do comportamento distinto com relação a estabilidade da curcumina em diferentes pH, tem-se que a incorporação da curcumina nos complexos polímero-surfatante aumentaram significativamente a estabilidade da molécula, em comparação ao sistema aquoso.

5.6 CINÉTICAS DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DOS SISTEMAS CARREADORES

Os ensaios de liberação da curcumina encapsulada em nanopartículas de PMVEAIM/CTAB foram acompanhados a partir de espectros de absorção UV-Vis em função do tempo, em pH 3 e 7. Uma vez que a curcumina é liberada do sistema de liberação, a mesma

precipita e pode ser separada por centrifugação, o que possibilitou a determinação da concentração de curcumina ainda presente no formulado. A **Figura 42a** mostra os espectros de absorção dos formulados com o tempo no pH 3, enquanto a **Figura 42c** mostra a liberação em pH 7. Em ambos os casos, a diminuição da intensidade de emissão tem uma relação direta com o aumento da curcumina liberada, como pode ser visto nas **Figuras 42b** e **42d**, para os pHs 3 e 7, respectivamente. As cinéticas de liberação foram ajustadas a modelos de primeira ordem ou duas etapas consecutivas de primeira ordem, os valores das constantes de velocidade de liberação são mostrados na **Tabela 7**. Em pH 3, a cinética de liberação seguiu um modelo de 1ª ordem, a constante de velocidade foi de $0,2 \text{ h}^{-1}$, com liberação de 25 % da curcumina. Em pH 7, a cinética de liberação ajustou-se a um modelo com duas etapas consecutivas. A constante de velocidade da primeira etapa foi de $1,82 \text{ h}^{-1}$ com liberação de 23 % da curcumina, enquanto na segunda etapa a constante de velocidade foi de $0,19 \text{ h}^{-1}$ com liberação de 46% da curcumina, totalizando aproximadamente 70% de curcumina em pH 7. Espera-se que a curcumina liberada em pH 3 e a liberada na primeira etapa no pH 7 sejam as moléculas localizadas mais externamente no formulado, como previamente discutido. Ainda que essa porcentagem seja próxima para os pHs 3 e 7, a velocidade de liberação desta fração de curcumina foi 10 vezes maior em pH 7. Além disso, em pH 7 houve a liberação de grande parte da curcumina localizada internamente no sistema de liberação. Esses resultados, indicam uma liberação da curcumina pH-responsiva no sistema de liberação desenvolvido.

Considerando os grupos funcionais presentes no polímero, imidazol e carboxilato, espera-se que uma liberação responsiva ao pH, mas em condições ácidas. Isso porque com a protonação dos grupos imidazóis (pKa de 6,7) e carboxilatos (pKa de 4,5) ter-se-ia uma grande quantidade de cargas positivas que iriam repelir as moléculas de CTAB, levando ao colapso da partícula e liberação da curcumina. É o que acontece com outros dispositivos de liberação sustentada funcionalizados com grupos imidazol já desenvolvidos, em que se observa a liberação pH-responsiva da curcumina mais rápida e eficiente em condições mais ácidas (pH ~5) em comparação a condições neutras (pH ~7). Além disso, os estudos também indicaram que a encapsulação da curcumina possibilitou aumentar a sua estabilidade química, conforme o observado neste trabalho.^{45,146–150} Apesar de inesperado, o resultado obtido está em concordância com as análises e caracterizações feitas previamente feitas para o polímero e para o complexo supramolecular. Em pH 3, há 26% da espécie E1 (totalmente protonada) e 74% da espécie E2 (imidazóis protonados e parte dos carboxilatos protonados), enquanto em pH 7 há 73% de E3 (imidazóis protonados e carboxilatos desprotonados) e 24% de E4 (carboxilatos

desprotonados e imidazol parcialmente protonado). Além disso, em pH 3 tem-se a formação de microambientes com polaridade intermediária, capaz de estabilizar a curcumina na forma ceto-enol, nesse caso espera-se interações hidrogênio relativamente forte entre a curcumina e o sistema de liberação. Por outro lado, em pH 7 tem-se a formação de microambientes hidrofóbicos capazes de solubilizar a curcumina e estabilizá-la na forma ceto, nesse caso espera-se interações mais fracas entre a curcumina e o sistema de liberação possibilitando a liberação pH-responsiva.

Figura 42. Espectros de absorção das nanopartículas e curva de variação das intensidades de absorção máxima em função do tempo: em pH 3 (a) e em pH 7 (b); e curvas da cinética de liberação da curcumina em função do tempo: em pH 3 (c) e em pH 7 (d).

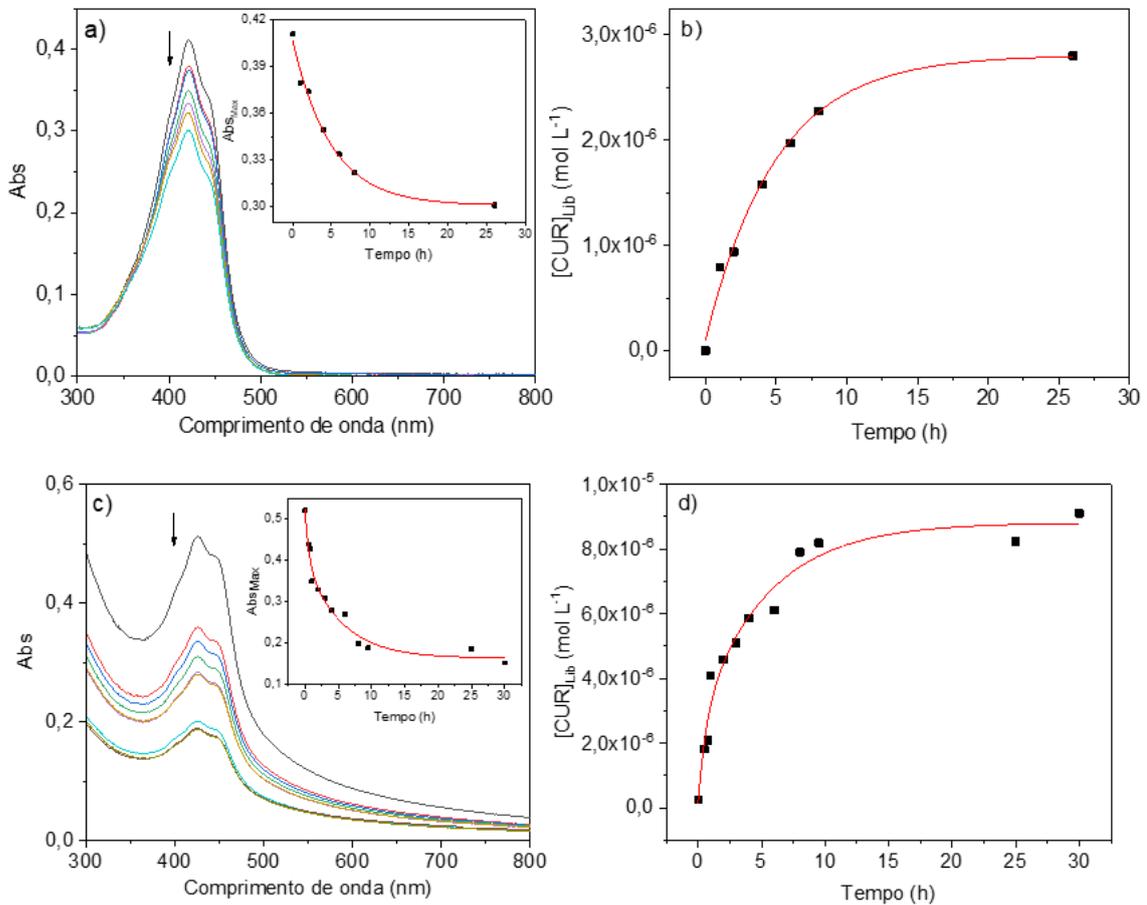


Tabela 7. Valores das constantes de velocidade de liberação (k), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e porcentagem de liberação em pH 3 e pH 7.

| | | k (h⁻¹) | t_{1/2} (h) | %lib |
|-------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|-------------|
| pH 3 | k₁ | 0,20±0,02 | 3,5 | 25% |
| | k₂ | - | - | |
| pH7 | k₁ | 1,82±0,20 | 0,38 | 23% |
| | k₂ | 0,19±0,08 | 3,6 | 46% |

Fazendo uma analogia com a aplicação do sistema de liberação desenvolvido, quando ingerido espera-se uma permanência no estômago (pH~2,0) de aproximadamente 2 horas¹⁵¹, onde haveria a liberação de apenas 6 % da curcumina encapsulada, enquanto o restante permaneceria no interior das nanopartículas protegido do ambiente ácido do estômago. A liberação ocorreria com maior eficiência ao alcançar um ambiente com pH neutro, como é o caso do cólon, em que após 1 hora mais de 30 % do conteúdo é liberado. Pode-se sugerir, portanto, que os formulados preparados com PMVEAIM/CTAB são uma boa alternativa para uso em terapias para o tratamento de câncer de cólon.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o polímero comercial PMVE-AM foi funcionalizado com grupos 1-(3-aminopropil)-imidazol (APIM) para a obtenção de um material inteligente passível de ser utilizado como um dispositivo de liberação sustentada pH-responsiva da curcumina. A metodologia utilizada para a funcionalização do polímero mostrou-se prática e rápida, podendo ser realizada com fácil replicabilidade. As técnicas de caracterização do polímero obtido PMVEAIM confirmaram a funcionalização do polímero com APIM. O polímero sintetizado mostrou equilíbrios ácido-base complexos, com dois pKas para o carboxilato e 2 pKas para o imidazol, em consequência de interações específicas entre os grupos funcionais.

O PMVEAIM foi investigado quanto a formação de complexos supramoleculares com surfactante catiônico CTAB em diferentes pHs. Apesar do polímero sozinho formar agregados auto-organizados meio aquoso, o grande número de grupos carregados levou a formação de microambientes polares o que inviabiliza a solubilização da curcumina. Na presença de CTAB, complexos polímero-surfactante foram observados, devido à interação eletrostática de atração entre as espécies desprotonadas do PMVEAIM e o CTA^+ , e interações hidrofóbicas. As propriedades dos complexos polímero/surfactante foram dependentes do pH, e em pH 3 os microdomínios apresentaram polaridade intermediária, enquanto em $\text{pH} > 6$, observou-se microambientes hidrofóbicos. O tamanho das partículas variou de 100 a 300 nm, e foram estáveis com o tempo. O potencial zeta dos sistemas particulados mostrou-se dependente do pH, sendo que em pH 3 as partículas apresentaram potencial zeta positivo, enquanto em $\text{pH} > 6$ o potencial zeta das nanoestruturas foi negativo.

Os sistemas de liberação nanoestruturados foram preparados a partir de uma metodologia simples, rápida, facilmente replicável e que requer apenas água como solvente. A incorporação da curcumina ocorreu com uma eficiência de 34,5%, levando ao aumento da solubilidade das moléculas e, portanto, contribuindo com o aumento da sua biodisponibilidade para uma possível absorção no organismo. A baixa citotoxicidade do polímero PMVEAIM e a ausência da utilização de solventes orgânicos na produção das nanopartículas torna esses dispositivos adequados para a aplicação médica. A incorporação da curcumina no sistema de liberação levou a um grande aumento da sua estabilidade em todos os pHs estudados, sendo que a estabilização observada foi dependente do pH do meio, e da polaridade dos microambientes.

Os estudos de liberação de curcumina dos sistemas nanoestruturados de PMVEAIM/CTAB indicaram uma liberação mais eficiente em pH 7, em um sistema pH-

responsivo. Combinado com a baixa taxa de degradação da curcumina encapsulada em ambientes ácidos e neutros, a baixa liberação do conteúdo incorporado em pH 3 garante que os sistemas consigam atravessar regiões do corpo que apresentam condições mais severas. Tratando-se de uma administração via oral, pode-se deduzir que a curcumina encapsulada consegue passar pela região do estômago protegida pela nanopartícula e chegar aos tecidos do cólon, que apresentam pH próximo de 7, onde ocorrerá a liberação. Dessa forma, conclui-se que o material inteligente preparado neste trabalho pode ser uma nova alternativa para aplicações terapêuticas em câncer de cólon.

REFERÊNCIAS

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Instituto Nacional do Câncer. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional do Câncer.* (Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica/CEDC, 2011).
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) & Ministério da Saúde. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.* (Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica/CEDC, 2019).
4. Singh, S., Sharma, B., Kanwar, S. S. & Kumar, A. Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. *Front. Plant Sci.* **7**, (2016).
5. Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P. & Schneider, G. Counting on natural products for drug design. *Nat. Chem.* **8**, 531–541 (2016).
6. Silva, P. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int. J. Nanomedicine* **1** (2013) doi:10.2147/IJN.S52634.
7. Duvoix, A. *et al.* Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* **223**, 181–190 (2005).
8. Xu, B., Watkins, R., Wu, L., Zhang, C. & Davis, R. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. *Int. J. Nanomedicine* **6055** (2015) doi:10.2147/IJN.S92162.
9. Kant, V. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 322–330 (2014).
10. Adams, B. K. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 3871–3883 (2004).
11. Li, Y. & Zhang, T. Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications. *Cancer Lett.* **346**, 197–205 (2014).
12. Ghosh, S., Banerjee, S. & Sil, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem. Toxicol.* **83**, 111–124 (2015).
13. Lin, S.-S. *et al.* Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Cancer Lett.* **285**, 127–133 (2009).
14. Praditya, D. *et al.* Anti-infective Properties of the Golden Spice Curcumin. *Front. Microbiol.* **10**, 912 (2019).

15. Gunes, H. *et al.* Antibacterial effects of curcumin: An *in vitro* minimum inhibitory concentration study. *Toxicol. Ind. Health* **32**, 246–250 (2016).
16. Zhang, C., Browne, A., Child, D. & Tanzi, R. E. Curcumin Decreases Amyloid- β Peptide Levels by Attenuating the Maturation of Amyloid- β Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 28472–28480 (2010).
17. Vogel, H. A. & Pelletier, J. Curcumin-biological and medicinal properties. *J. Pharma.* **2:50**, (1815).
18. Vogel Jr, A. *Journal de Pharma. et de Chemie* **3:20**, (1842).
19. Miłobędzka, J., v. Kostanecki, St. & Lampe, V. Zur Kenntnis des Curcumins. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **43**, 2163–2170 (1910).
20. Priyadarsini, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* **19**, 20091–20112 (2014).
21. Agrawal, D. K. & Mishra, P. K. Curcumin and its analogues: Potential anticancer agents. *Med. Res. Rev.* n/a-n/a (2009) doi:10.1002/med.20188.
22. Lee, W.-H. *et al.* Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 338–378 (2013).
23. Priyadarsini, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **10**, 81–95 (2009).
24. Rahman, S., Telny, T., Ravi, T. & Kuppasamy, S. Role of surfactant and pH in dissolution of curcumin. *Indian J. Pharm. Sci.* **71**, 139 (2009).
25. Jovanovic, S. V., Steenken, S., Boone, C. W. & Simic, M. G. H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9677–9681 (1999).
26. Sueth-Santiago, V., Mendes-Silva, G. P., Decoté-Ricardo, D. & Lima, M. E. F. de. CURCUMIN, THE GOLDEN POWDER FROM TURMERIC: INSIGHTS INTO CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. *Quím. Nova* (2015) doi:10.5935/0100-4042.20150035.
27. Chignell, C. F. *et al.* SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. *Photochem. Photobiol.* **59**, 295–302 (1994).
28. Zsila, F., Bikádi, Z. & Simonyi, M. Unique, pH-dependent biphasic band shape of the visible circular dichroism of curcumin–serum albumin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 776–782 (2003).
29. Shen, L. & Ji, H.-F. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **67**, 619–623 (2007).

30. Puglisi, A., Giovannini, T., Antonov, L. & Cappelli, C. Interplay between conformational and solvent effects in UV-visible absorption spectra: curcumin tautomers as a case study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 15504–15514 (2019).
31. Jasim, F. & Ali, F. Measurements of some spectrophotometric parameters of curcumin in 12 polar and nonpolar organic solvents. *Microchem. J.* **39**, 156–159 (1989).
32. Reichardt, C. & Welton, T. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: REICHARDT:SOLV.EFF. 4ED O-BK.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010). doi:10.1002/9783527632220.
33. Tahay, P., Parsa, Z., Zamani, P. & Safari, N. A structural and optical study of curcumin and curcumin analogs. *J. Iran. Chem. Soc.* **19**, 3177–3188 (2022).
34. Moussa, Z., Chebl, M. & Patra, D. Fluorescence of tautomeric forms of curcumin in different pH and biosurfactant rhamnolipids systems: Application towards on-off ratiometric fluorescence temperature sensing. *J. Photochem. Photobiol. B* **173**, 307–317 (2017).
35. Aboudiab, B., Tehrani-Bagha, A. R. & Patra, D. Curcumin degradation kinetics in micellar solutions: Enhanced stability in the presence of cationic surfactants. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **592**, 124602 (2020).
36. Mondal, S., Ghosh, S. & Moulik, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *J. Photochem. Photobiol. B* **158**, 212–218 (2016).
37. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73–91 (1995).
38. Kumar, G., Mittal, S., Sak, K. & Tuli, H. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive potential of curcumin: Current challenges and future perspectives. *Life Sci.* **148**, 313–328 (2016).
39. Panda, A. K., Chakraborty, D., Sarkar, I., Khan, T. & Sa, G. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J. Exp. Pharmacol.* **Volume 9**, 31–45 (2017).
40. Ravindranath, V. & Chandrasekhara, N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* **16**, 259–265 (1980).
41. Naksuriya, O., Okonogi, S., Schiffelers, R. M. & Hennink, W. E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* **35**, 3365–3383 (2014).
42. Nagahama, K. *et al.* Discovery of a new function of curcumin which enhances its anticancer therapeutic potency. *Sci. Rep.* **6**, 30962 (2016).
43. Shaikh, J., Ankola, D. D., Beniwal, V., Singh, D. & Kumar, M. N. V. R. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared

- to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**, 223–230 (2009).
44. Dende, C. *et al.* Nanocurcumin is superior to native curcumin in preventing degenerative changes in Experimental Cerebral Malaria. *Sci. Rep.* **7**, 10062 (2017).
 45. Xu, Y. *et al.* pH-Responsive nanoparticles based on cholesterol/imidazole modified oxidized-starch for targeted anticancer drug delivery. *Carbohydr. Polym.* **233**, 115858 (2020).
 46. Bisht, S. *et al.* Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ('nanocurcumin'): a novel strategy for human cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* **5**, 3 (2007).
 47. Ng, S. W., Selvarajah, G. T., Hussein, M. Z., Yeap, S. K. & Omar, A. R. *In Vitro* Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles against Feline Infectious Peritonitis Virus and Pharmacokinetics Study in Cats. *BioMed Res. Int.* **2020**, 1–18 (2020).
 48. Mohanty, C., Acharya, S., Mohanty, A. K., Dilnawaz, F. & Sahoo, S. K. Curcumin-encapsulated MePEG/PCL diblock copolymeric micelles: a novel controlled delivery vehicle for cancer therapy. *Nanomed.* **5**, 433–449 (2010).
 49. Bechnak, L., Khalil, C., El Kurdi, R., Khnayzer, R. S. & Patra, D. Curcumin encapsulated colloidal amphiphilic block co-polymeric nanocapsules: colloidal nanocapsules enhance photodynamic and anticancer activities of curcumin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **19**, 1088–1098 (2020).
 50. Krausz, A. E. *et al.* Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 195–206 (2015).
 51. Bisht, S. *et al.* Systemic Administration of Polymeric Nanoparticle-Encapsulated Curcumin (NanoCure) Blocks Tumor Growth and Metastases in Preclinical Models of Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2255–2264 (2010).
 52. Marslin, G. *et al.* Curcumin Encapsulated into Methoxy Poly(Ethylene Glycol) Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles Increases Cellular Uptake and Neuroprotective Effect in Glioma Cells. *Planta Med.* **83**, 434–444 (2016).
 53. Zhang, L., Yang, S., Wong, L. R., Xie, H. & Ho, P. C.-L. *In Vitro* and *In Vivo* Comparison of Curcumin-Encapsulated Chitosan-Coated Poly(lactic- *co* -glycolic acid) Nanoparticles and Curcumin/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes Administered Intranasally as Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease. *Mol. Pharm.* **17**, 4256–4269 (2020).
 54. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-IN27 (1965).
 55. Graham, N. B. Polymeric Inserts and Implants for the Controlled Release of Drugs. *Br. Polym. J.* **10**, 260–266 (1978).
 56. Farokhzad, O. C. & Langer, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano* **3**, 16–20 (2009).

57. Sercombe, L. *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **6**, (2015).
58. Zhang, J. & Ma, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1215–1233 (2013).
59. Yin, Y. *et al.* Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* **12**, 290 (2020).
60. Patra, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **16**, 71 (2018).
61. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. & Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **33**, 2373–2387 (2016).
62. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng. Transl. Med.* **4**, (2019).
63. Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S. & Shin, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1909–1917 (2006).
64. Sun, T. *et al.* Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* n/a-n/a (2014) doi:10.1002/anie.201403036.
65. Pérez-Herrero, E. & Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 52–79 (2015).
66. Robitzki, A. A. & Kurz, R. Biosensing and Drug Delivery at the Microscale. in *Drug Delivery* (ed. Schäfer-Korting, M.) vol. 197 87–112 (Springer Berlin Heidelberg, 2010).
67. Ramasamy, T. *et al.* Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review. *J. Controlled Release* **258**, 226–253 (2017).
68. Mura, S., Nicolas, J. & Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **12**, 991–1003 (2013).
69. Schild, H. G. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.* **17**, 163–249 (1992).
70. Pasparakis, G. & Tsitsilianis, C. LCST polymers: Thermoresponsive nanostructured assemblies towards bioapplications. *Polymer* **211**, 123146 (2020).
71. Xu, X. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Composite Hydrogels for Biomedical Applications. *Polymers* **12**, 580 (2020).
72. Jain, K., Vedarajan, R., Watanabe, M., Ishikiriyama, M. & Matsumi, N. Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. *Polym. Chem.* **6**, 6819–6825 (2015).

73. Idziak, I., Avoce, D., Lessard, D., Gravel, D. & Zhu, X. X. Thermosensitivity of Aqueous Solutions of Poly(*N,N* -diethylacrylamide). *Macromolecules* **32**, 1260–1263 (1999).
74. Gazon, C., Rieger, J., Sanson, N. & Charleux, B. Study of poly(*N,N*-diethylacrylamide) nanogel formation by aqueous dispersion polymerization of *N,N*-diethylacrylamide in the presence of poly(ethylene oxide)-*b*-poly(*N,N*-dimethylacrylamide) amphiphilic macromolecular RAFT agents. *Soft Matter* **7**, 3482 (2011).
75. Kasza, G. *et al.* Thermoresponsive Poly(*N,N*-diethylacrylamide-co-glycidyl methacrylate) Copolymers and Its Catalytically Active α -Chymotrypsin Bioconjugate with Enhanced Enzyme Stability. *Polymers* **13**, 987 (2021).
76. Kishi, R., Ichijo, H. & Hirasa, O. Thermo-Responsive Devices Using Poly(vinyl methyl ether) Hydrogels. *J. Intell. Mater. Syst. Struct.* **4**, 533–537 (1993).
77. Arndt, K.-F., Schmidt, T. & Reichelt, R. Thermo-sensitive poly(methyl vinyl ether) microgel formed by high energy radiation. *Polymer* **42**, 6785–6791 (2001).
78. Bulychev, N. *et al.* Application of thermo-responsive poly(methyl vinyl ether) containing copolymers in combination with ultrasonic treatment for pigment surface modification in pigment dispersions. *Polymer* **48**, 2636–2643 (2007).
79. Liu, J., Debuigne, A., Detrembleur, C. & Jérôme, C. Poly(*N* -vinylcaprolactam): A Thermoresponsive Macromolecule with Promising Future in Biomedical Field. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1941–1968 (2014).
80. Cortez-Lemus, N. A. & Licea-Claverie, A. Poly(*N*-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Prog. Polym. Sci.* **53**, 1–51 (2016).
81. Sala, R. L. *et al.* <sup/> Thermosensitive Poly(*N*-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **23**, 935–945 (2017).
82. Alvarez-Lorenzo, C. & Concheiro, A. Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic. *Chem Commun* **50**, 7743–7765 (2014).
83. Linsley, C. S. & Wu, B. M. Recent advances in light-responsive on-demand drug-delivery systems. *Ther. Deliv.* **8**, 89–107 (2017).
84. *Smart polymers and their applications.* (Woodhead Publishing, is an imprint of Elsevier, 2014).
85. Connal, L. A. *et al.* pH-Responsive Poly(acrylic acid) Core Cross-Linked Star Polymers: Morphology Transitions in Solution and Multilayer Thin Films. *Macromolecules* **41**, 2620–2626 (2008).
86. Tian, B. *et al.* pH-responsive poly (acrylic acid)-gated mesoporous silica and its application in oral colon targeted drug delivery for doxorubicin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **154**, 287–296 (2017).

87. Gupta, P. & Purwar, R. Electrospun pH responsive poly (acrylic acid-co- acrylamide) hydrogel nanofibrous mats for drug delivery. *J. Polym. Res.* **27**, 296 (2020).
88. Li, G., Song, S., Guo, L. & Ma, S. Self-assembly of thermo- and pH-responsive poly(acrylic acid)- *b* -poly(*N* -isopropylacrylamide) micelles for drug delivery. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 5028–5035 (2008).
89. Zhang, Y.-W., Guan, W.-J., Lu, Y.-M. & Zhao, J.-X. Efficient and “green” fabrication of pH-responsive poly(methacrylic acid) nano-hydrogels in water. *RSC Adv.* **6**, 66571–66578 (2016).
90. Robinson, D. N. & Peppas, N. A. Preparation and Characterization of pH-Responsive Poly(methacrylic acid- *g* -ethylene glycol) Nanospheres. *Macromolecules* **35**, 3668–3674 (2002).
91. Yang, P. *et al.* Stimuli-responsive biodegradable poly(methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials* **35**, 2079–2088 (2014).
92. Torres-Ávalos, J. A. *et al.* Synthesis of Poly(methacrylic acid-co-butyl acrylate) Grafted onto Functionalized Carbon Nanotube Nanocomposites for Drug Delivery. *Polymers* **13**, 533 (2021).
93. Zhao, Y., Su, H., Fang, L. & Tan, T. Superabsorbent hydrogels from poly(aspartic acid) with salt-, temperature- and pH-responsiveness properties. *Polymer* **46**, 5368–5376 (2005).
94. Li, Q. *et al.* Poly(aspartic acid)-based pH-responsive targeting co-delivery nanoparticles. *J. Biomater. Appl.* **36**, 579–591 (2021).
95. Zhou, M. *et al.* Self-Propelled and Targeted Drug Delivery of Poly(aspartic acid)/Iron–Zinc Microrocket in the Stomach. *ACS Nano* acsnano.8b06773 (2019) doi:10.1021/acsnano.8b06773.
96. Deirram, N., Zhang, C., Kermaniyan, S. S., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. pH-Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery. *Macromol. Rapid Commun.* **40**, 1800917 (2019).
97. Lee, C. H., Kang, S. K., Lim, J. A., Lim, H. S. & Cho, J. H. Electrospun smart fabrics that display pH-responsive tunable wettability. *Soft Matter* **8**, 10238 (2012).
98. Liang, K. *et al.* Peptide-Tunable Drug Cytotoxicity via One-Step Assembled Polymer Nanoparticles. *Adv. Mater.* **26**, 2398–2402 (2014).
99. Ellis, E. *et al.* Biocompatible pH-responsive nanoparticles with a core-anchored multilayer shell of triblock copolymers for enhanced cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* **5**, 4421–4425 (2017).
100. Sim, T. *et al.* A pH-Sensitive Polymer for Cancer Targeting Prepared by One-Step Modulation of Functional Side Groups. *Macromol. Res.* **27**, 795–802 (2019).

101. Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1655–1670 (2006).
102. Sundberg, R. J. & Martin, R. B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. *Chem. Rev.* **74**, 471–517 (1974).
103. Jin, B. S., Kang, H. C., Kim, D., Lee, K. H. & Bae, Y. H. Synthesis of poly(cystine bisamide)-PEG block copolymers grafted with 1-(3-aminopropyl)imidazole and their phase transition behaviors: Synthesis and phase transition of PCBI-*b*-PEG. *Polym. Adv. Technol.* **19**, 1558–1565 (2008).
104. Matuszak, C. A. & Matuszak, A. J. Imidazole - Versatile today, prominent tomorrow. *J. Chem. Educ.* **53**, 280 (1976).
105. Su, T. *et al.* Functionalization of biodegradable hyperbranched poly(α,β -malic acid) as a nanocarrier platform for anticancer drug delivery. *RSC Adv.* **5**, 13157–13165 (2015).
106. Han, S. M. *et al.* Development of a pH-Responsive Polymer Based on Hyaluronic Acid Conjugated with Imidazole and Dodecylamine for Nanomedicine Delivery. *Macromol. Res.* (2022) doi:10.1007/s13233-022-0063-3.
107. *Surfactants and polymers in aqueous solution.* (John Wiley & Sons, 2003).
108. Tanford, C. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes.* (Wiley, 1973).
109. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces.* (Academic press, 2011).
110. Kamei, D. T. Protein and viral partitioning in two-phases aqueous micellar systems. (Massachusetts Institute of Technology, 2001).
111. Paula, S., Sues, W., Tuchtenhagen, J. & Blume, A. Thermodynamics of Micelle Formation as a Function of Temperature: A High Sensitivity Titration Calorimetry Study. *J. Phys. Chem.* **99**, 11742–11751 (1995).
112. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **437**, 640–647 (2005).
113. Blanzat, M. Premiers Analogues Catanioniques du Galactosylcéramide. Synthèse Ciblée et Évaluation de leurs Propriétés Anti-VIH. (Université Paul Sabatier, 2000).
114. Brasher, L. L., Herrington, K. L. & Kaler, E. W. Electrostatic Effects on the Phase Behavior of Aqueous Cetyltrimethylammonium Bromide and Sodium Octyl Sulfate Mixtures with Added Sodium Bromide. *Langmuir* **11**, 4267–4277 (1995).
115. Marques, E. F., Regev, O., Khan, A. & Lindman, B. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. *Adv. Colloid Interface Sci.* **100–102**, 83–104 (2003).

116. Dong, R. & Hao, J. Complex Fluids of Poly(oxyethylene) Monoalkyl Ether Nonionic Surfactants. *Chem. Rev.* **110**, 4978–5022 (2010).
117. Yang, J. & Pal, R. Investigation of Surfactant-Polymer Interactions Using Rheology and Surface Tension Measurements. *Polymers* **12**, 2302 (2020).
118. Breuer, M. M. & Robb, I. D. Interaction between macromolecules and detergents. *Chem. Ind.* **13**, 530–535 (1972).
119. Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*. (John Wiley & Sons, 1970).
120. Bains, G., Patel, A. B. & Narayanaswami, V. Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes. *Molecules* **16**, 7909–7935 (2011).
121. Dong, D. C. & Winnik, M. A. THE Py SCALE OF SOLVENT POLARITIES. SOLVENT EFFECTS ON THE VIBRONIC FINE STRUCTURE OF PYRENE FLUORESCENCE and EMPIRICAL CORRELATIONS WITH E_T and Y VALUES. *Photochem. Photobiol.* **35**, 17–21 (1982).
122. Hu, G. H. & Lindt, J. T. Amidification of poly(styrene-co-maleic anhydride) with amines in tetrahydrofuran solution: A kinetic study. *Polym. Bull.* **29**, 357–363 (1992).
123. Cegłowski, M., Gierczyk, B. & Schroeder, G. Poly(methyl vinyl ether- *alt* -maleic anhydride) functionalized with 3-aminophenylboronic acid: A new boronic acid polymer for sensing diols in neutral water. *J. Appl. Polym. Sci.* **131**, n/a-n/a (2014).
124. Jin, Z. *et al.* Modification of Poly(maleic anhydride)-Based Polymers with H_2N-R Nucleophiles: Addition or Substitution Reaction? *Bioconjug. Chem.* **30**, 871–880 (2019).
125. Maeda, H., Ueda, M., Morinaga, T. & Matsumoto, T. Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological properties. *J. Med. Chem.* **28**, 455–461 (1985).
126. Pawlaczyk, M. & Schroeder, G. Dual-Polymeric Resin Based on Poly(methyl vinyl ether-*alt* -maleic anhydride) and PAMAM Dendrimer as a Versatile Supramolecular Adsorbent. *ACS Appl. Polym. Mater.* **3**, 956–967 (2021).
127. Arbós, P., Wirth, M., Arangoa, M. A., Gabor, F. & Irache, J. M. Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand–nanoparticle conjugates. *J. Controlled Release* **83**, 321–330 (2002).
128. Yoncheva, K., Lizarraga, E. & Irache, J. M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**, 411–419 (2005).
129. Zhang, D. *et al.* Multifunctional Poly(methyl vinyl ether- *co* -maleic anhydride)- *graft* -hydroxypropyl- β -cyclodextrin Amphiphilic Copolymer as an Oral High-Performance Delivery Carrier of Tacrolimus. *Mol. Pharm.* **12**, 2337–2351 (2015).
130. Luppi, B. *et al.* Crosslinked Poly(Methyl Vinyl Ether-Co-Maleic Anhydride) as Topical Vehicles for Hydrophilic and Lipophilic Drugs. *Drug Deliv.* **10**, 239–244 (2003).

131. Elizondo, E. *et al.* High Loading of Gentamicin in Bioadhesive PVM/MA Nanostructured Microparticles Using Compressed Carbon-Dioxide. *Pharm. Res.* **28**, 309–321 (2011).
132. Zabaleta, V. *et al.* Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride) nanoparticles: Permeability and pharmacokinetic study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 514–523 (2012).
133. Larrañeta, E., Barturen, L., Ervine, M. & Donnelly, R. F. Hydrogels based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) and Tween 85 for sustained delivery of hydrophobic drugs. *Int. J. Pharm.* **538**, 147–158 (2018).
134. Castañeda, P. S. *et al.* Development of Poly (Methyl vinyl ether-alt-maleic acid) Microneedles for Transdermal Delivery of Atorvastatin Calcium. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **21**, 852–861 (2020).
135. Tsaplev, Y. B., Lapina, V. A. & Trofimov, A. V. Curcumin in dimethyl sulfoxide: Stability, spectral, luminescent and acid-base properties. *Dyes Pigments* **177**, 108327 (2020).
136. Zebib, B., Mouloungui, Z. & Noirot, V. Stabilization of Curcumin by Complexation with Divalent Cations in Glycerol/Water System. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2010**, 1–8 (2010).
137. Bhatia, N. K. *et al.* Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol. *RSC Adv.* **6**, 103275–103288 (2016).
138. Bong, P. H. Spectral and Photophysical Behaviors of Curcumin and Curcuminoids. *Bull. Korean Chem. Soc.* **21**, 81–86 (2000).
139. King, S.-T. Low-temperature matrix isolation study of hydrogen-bonded, high-boiling organic compounds. I. Sampling device and the infrared spectra of pyrazole, imidazole, and dimethylphosphinic acid. *J. Phys. Chem.* **74**, 2133–2138 (1970).
140. Li, J. *et al.* Phase Transition and Side-Chain Crystallization of Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride)-*g*-Alkyl Alcohol Comb-like Polymers. *Macromolecules* **51**, 8922–8931 (2018).
141. Haynes, W. M. *Handbook of Chemistry and Physics.* (CRC Press, 2014).
142. James, M. N. G. & Williams, G. J. B. A refinement of the crystal structure of maleic acid. *Acta Crystallogr. B* **30**, 1249–1257 (1974).
143. Trull, F. R., Boiadjev, S., Lightner, D. A. & McDonagh, A. F. Aqueous dissociation constants of bile pigments and sparingly soluble carboxylic acids by ¹³C NMR in aqueous dimethyl sulfoxide: effects of hydrogen bonding. *J. Lipid Res.* **38**, 1178–1188 (1997).
144. Li, W., Zhang, M., Zhang, J. & Han, Y. Self-assembly of cetyl trimethylammonium bromide in ethanol-water mixtures. *Front. Chem. China* **1**, 438–442 (2006).
145. Wang, Y.-J. *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 1867–1876 (1997).

146. Ju, L. *et al.* Preparation and properties evaluation of a novel pH-sensitive liposomes based on imidazole-modified cholesterol derivatives. *Int. J. Pharm.* **518**, 213–219 (2017).
147. Raveendran, R., Bhuvaneshwar, G. S. & Sharma, C. P. Hemocompatible curcumin–dextran micelles as pH sensitive pro-drugs for enhanced therapeutic efficacy in cancer cells. *Carbohydr. Polym.* **137**, 497–507 (2016).
148. Hong, W. *et al.* pH-sensitive micelles for the intracellular co-delivery of curcumin and Pluronic L61 unimers for synergistic reversal effect of multidrug resistance. *Sci. Rep.* **7**, 42465 (2017).
149. Tiwari, A., Singh, A., Garg, N. & Randhawa, J. K. Curcumin encapsulated zeolitic imidazolate frameworks as stimuli responsive drug delivery system and their interaction with biomimetic environment. *Sci. Rep.* **7**, 12598 (2017).
150. Xu, B. *et al.* Novel Polymeric Hybrid Nanocarrier for Curcumin and Survivin shRNA Co-delivery Augments Tumor Penetration and Promotes Synergistic Tumor Suppression. *Front. Chem.* **8**, 762 (2020).
151. Hua, S., Marks, E., Schneider, J. J. & Keely, S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 1117–1132 (2015).

APÊNDICE A

FIGURA A1. Titulação potenciométrica do polímero PMVEAIM ($1,4 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$) com o titulante KOH ($0,097$ mol L $^{-1}$).

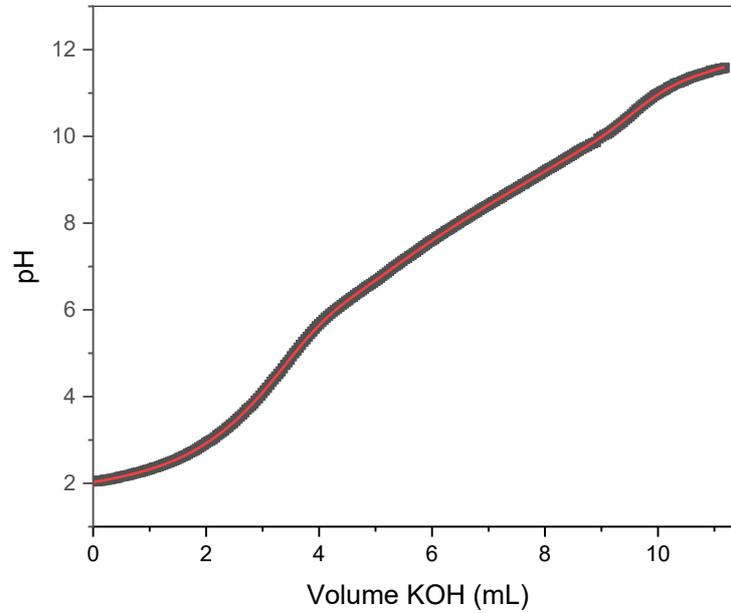


FIGURA A2. Titulação potenciométrica do polímero PMVEAIM ($4,5 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$) com o titulante KOH ($0,097$ mol L $^{-1}$).

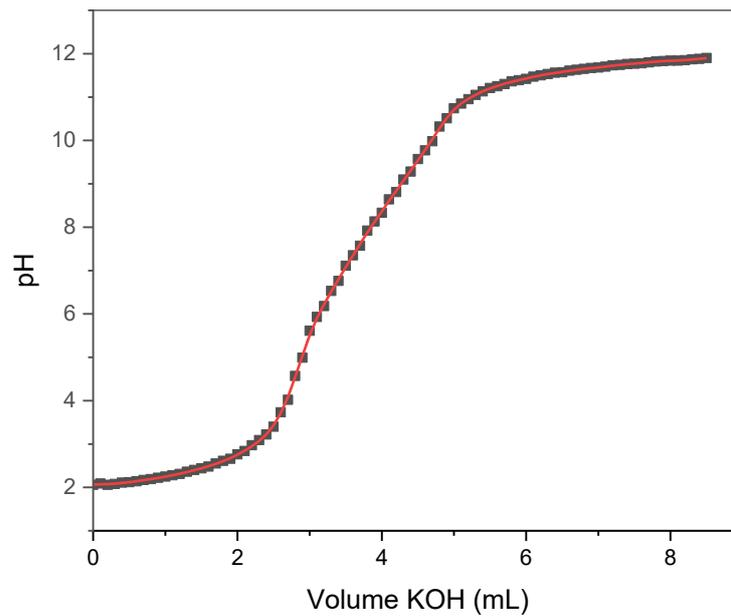


FIGURA A3. Espectros de emissão de fluorescência do pireno na presença de PMVEAIM ($9,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função da concentração de CTAB em pH 6.

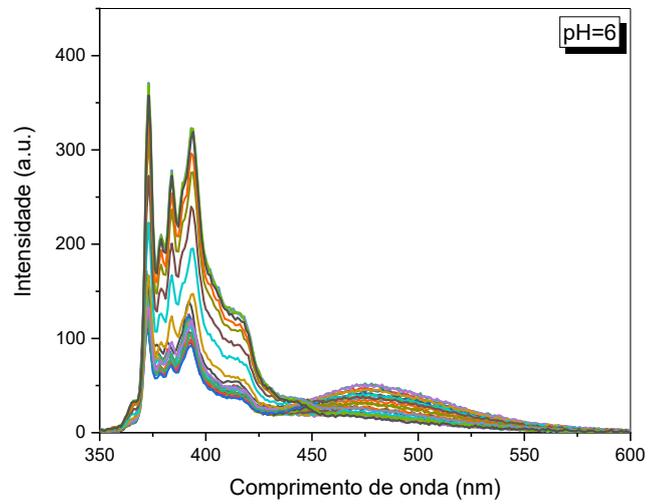


FIGURA A4. Espectros de emissão de fluorescência do pireno na presença de PMVEAIM ($9,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função da concentração de CTAB em pH 3.

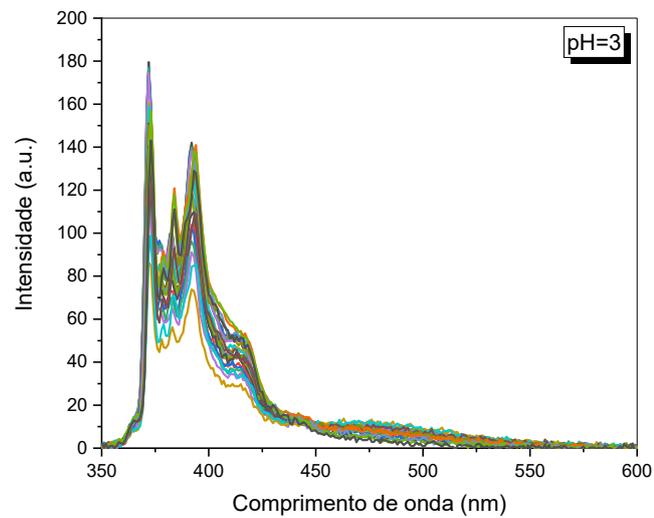


Tabela A1. Tamanhos hidrodinâmicos e potencial zeta dos agregados de PMVEAIM/CTAB em função de [CTAB] em pH 9.

| | [CTAB] (mol L ⁻¹) | Tamanho das partículas (nm) | Potencial zeta (mV) |
|--------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 0 µL | - | 84,5 | -25,7 |
| 50 µL | 1,22x10 ⁻⁴ | 97,7 | -20,1 |
| 60 µL | 1,45x10 ⁻⁴ | 79,6 | -23,3 |
| 100 µL | 2,37x10 ⁻⁴ | 214,7 | 6,43 |
| 200 µL | 4,53x10 ⁻⁴ | 113,9 | 15,9 |
| 240 µL | 5,36x10 ⁻⁴ | 51,2 | 22,1 |
| 300 µL | 6,52x10 ⁻⁴ | 81,6 | 43,2 |
| 360 µL | 7,62x10 ⁻⁴ | 77,1 | 43,2 |
| 500 µL | 1,15x10 ⁻³ | 49,2 | 45 |
| 800 µL | 1,43x10 ⁻³ | 39,5 | 22,4 |

Tabela A2. Tamanhos hidrodinâmicos e potencial zeta dos agregados de PMVEAIM/CTAB em função de [CTAB] em pH 6.

| | [CTAB] (mol L ⁻¹) | Tamanho das partículas (nm) | Potencial zeta (mV) |
|--------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 0 µL | - | 137,6 | -9,71 |
| 100 µL | 2,37x10 ⁻⁴ | 178,0 | -13,8 |
| 200 µL | 4,53x10 ⁻⁴ | 74,7 | 19,4 |
| 500 µL | 9,98x10 ⁻⁴ | 83,9 | 25,7 |
| 800 µL | 1,43x10 ⁻³ | 49,0 | 7,98 |

Tabela A3. Tamanhos hidrodinâmicos e potencial zeta dos agregados de PMVEAIM/CTAB em função de [CTAB] em pH 3.

| | [CTAB] (mol L ⁻¹) | Tamanho das partículas (nm) | Potencial zeta (mV) |
|--------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 0 µL | - | 71,2 | -0,04 |
| 100 µL | 2,37x10 ⁻⁴ | 84,7 | 47,8 |
| 200 µL | 4,53x10 ⁻⁴ | 169,9 | 51,4 |
| 500 µL | 9,98x10 ⁻⁴ | 98,5 | 52,3 |

| | | | |
|-------------------|-----------------------|-----|------|
| 800 μL | $1,43 \times 10^{-3}$ | 3,0 | 42,0 |
|-------------------|-----------------------|-----|------|