



ENCAPSULAMENTO DE RIVASTIGMINA EM NANOPARTÍCULAS DE
P(MMA- co-AA) FUNCIONALIZADAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS

Lys Hamond Regua Mangia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018

ENCAPSULAMENTO DE RIVASTIGMINA EM NANOPARTÍCULAS DE
P(MMA- co-AA) FUNCIONALIZADAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS

Lys Hamond Regua Mangia

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof^a. Bartira Rossi Bergmann, D.Sc.

Dr. Helvécio Vinicius Antunes Rocha, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2018

Mangia, Lys Hamond Regua

Encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas de P(MMA-co-AA) funcionalizadas para tratamento de doenças neurodegenerativas/ Lys Hamond Regua Mangia. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XVIII, 121 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 109-116.

1. Encapsulamento de rivastigmina. 2. Funcionalização de polímeros. 3. Entrega sítio-dirigida ao cérebro. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Aos meus pais,
Adriana e Luiz,
e à minha irmã,
Louise.

Agradecimentos

A minha família que sempre foi o meu alicerce e sempre incentivou meus estudos. Nesse meio também entra a minha cachorrinha, Mili, grande companheira das madrugadas de escrita.

A Professora Helen pela grande disposição, cooperação essencial no desenvolvimento das minhas hipóteses e incentivo frequente (“Está tudo ótimo!”).

Ao Professor José Carlos pelo esclarecimento dos fenômenos envolvidos, auxílio fundamental no processo experimental e motivação constante (“Tá feliz, Lys?”).

Aos meus colegas de turma 2016 por me proporcionarem a válvula de escape necessária para um andamento mais leve e saudável da minha dissertação: Daniel (“Lyxxx”), Diulia (“vamos viajar?”), Jamili e Natali (as gêmeas que não são um pacote só), Letícia Loira (“Projectus às 10h?”), Letícia Morena (“vai dar tudo certo!”), Victória (“bora pão de queijo?”), Talita (arco e flecha é a nova moda), Vitor (ainda vamos tirar foto sem aparelho)... Não posso esquecer também dos meus colegas de comissão de assuntos acadêmicos: Maria Rosa (cujo dia tem 40h), Marcel (sempre hiperativo) e os meninos da modelagem: Felipe, Guilherme, Léo e Vitor Pirovani.

Aos meus amigos de laboratório (EngePol e GRIFIT) por me socorrerem tanto intelectual quanto fisicamente (Anderson’s, Débora’s, Eduardo, Gustavo, João Victor, Luciana, Nicolis, Rayany, Thamiris^{S2}, Jéssica – “Jessy, me ajuda a levar a bandeja pro Engepol?”). E, em especial, a Izabella Campos por não só proporcionar várias referências valiosas como também por ter me aceitado como a sua pupila sendo sempre muito paciente e atenciosa.

A Dr^a Mirian Pereira por me recepcionar tão bem no Laboratório de Ultraestrutura Celular/FIOCRUZ, possibilitando uma parceria valiosa no trabalho e a Renata pela ajuda na condução experimental. Ao Laboratório Multiusuário de RMN de sólidos/IQ pelas análises. Ao pessoal do LabBIO pela ajuda no processo de esterilização. As meninas do Engepol (Larissa, Nathalie e Natasha) pelas caracterizações e disponibilidade. A Amanda, ao Jorge e ao Ricardo pela recepção acolhedora nos devidos laboratórios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos.

L'homme se découvre lorsqu'il se mesure à un obstacle.

(Antoine Saint-Exupéry)

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ENCAPSULAMENTO DE RIVASTIGMINA EM NANOPARTÍCULAS DE
P(MMA- co-AA) FUNCIONALIZADAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS

Lys Hamond Regua Mangia

Fevereiro/2018

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Programa: Engenharia Química

A doença de Alzheimer é uma doença terminal cujo maior fator de risco associado é o envelhecimento e espera-se crescimento significativo da doença nas próximas décadas. Os medicamentos utilizados apresentam efeitos adversos e dificuldade para atravessar a barreira hematoencefálica, onde está o alvo de ação. Dentre eles, destaca-se a rivastigmina, muito utilizada nas fases inicial e moderada da doença. O presente trabalho visou ao encapsulamento deste fármaco em nanopartículas de P(MMA-co-AA) funcionalizadas para liberação sítio-dirigida. Estudou-se a variação do teor de comonômero entre 7,5% a 15% em massa. Foram obtidos copolímeros contendo de 3% a 5% em massa do comonômero. Apesar das eficiências de encapsulamento serem superiores a 70%, o encapsulamento de 0,5% de fármaco identificou interação com o meio reacional. A melhor composição atingida foi de 205,63 mg encapsulados em P(MMA-co-AA) 7,5%. A bioconjugação foi bem sucedida e os teores de copolímero e fármaco não influenciaram no processo. A concentração citotóxica obtida foi semelhante para todas as formulações testadas e inferiores às concentrações requeridas em ensaios clínicos (1400 µg de nanopartícula/mL e 50 µg rivastigmina/mL). Foi observada permeação através de membrana celular independente do uso de TAT. Assim, comprovou-se o potencial uso destas nanopartículas como carreadores de rivastigmina através de barreiras fisiológicas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ENCAPSULATION OF RIVASTIGMINE IN FUNCTIONALIZED P(MMA-co-AA)
NANOPARTICLES FOR TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Lys Hamond Regua Mangia

February/2018

Advisors: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

The Alzheimer disease is a terminal illness that is associated mostly with aging. For this reason a significant growth of the number of patients is expected to take place in the forthcoming decades. The medications currently used exert adverse effects and great difficulty to cross the blood-brain barrier, where the target is located. Rivastigmine is widely used in early and moderate phases of the disease. For this reason, the present work proposes the encapsulation of this drug in functionalized P(MMA-co-AA) nanoparticles for site-specific delivery. The comonomer content was varied between 7.5wt% and 15wt% in the reaction medium, leading to incorporation of 3 to 5% in copolymer. Despite the high encapsulation efficiencies (above 70wt%), 0.5wt% of the drug was sufficient to provoke interaction between the reaction media and the drug. The best conformation attained was 205.63 mg encapsulated in P(MMA-co-AA) 7.5wt%. Bio conjugation technique were used satisfactorily to functionalize polymer particles and both the copolymer composition and drug content did not affect the process. The cytotoxic concentration obtained was shown to be similar for all tested formulations and lower than clinical trial concentrations (1400 μg nanoparticle / mL and 50 μg rivastigmine / mL). High permeability through cell membrane was obtained in all cases, even when bioconjugation with TAT was not performed. Thus, it is possible to assume the potential use of these nanoparticles as carriers of rivastigmine through physiological barriers.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
Capítulo I	1
INTRODUÇÃO	1
Capítulo II.....	5
OBJETIVOS.....	5
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	5
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	5
Capítulo III	6
REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. <i>Doenças Neurodegenerativas</i>	6
3.1.1. <i>Doença de Alzheimer</i>	7
3.1.2. <i>Fármacos para tratamento da Doença de Alzheimer</i>	9
3.2. <i>Sistemas de Liberação</i>	11
3.2.1. <i>Direcionamento de Fármacos para o Sistema Nervoso Central</i>	12
3.2.2. <i>Barreira Hematoencefálica</i>	15
3.3. <i>Nanopartículas Poliméricas</i>	20
3.3.1. <i>Polímeros utilizados em Sistemas de Liberação</i>	22
3.3.2. <i>Técnicas de Preparo de Nanopartículas Poliméricas</i>	23
3.3.3. <i>Encapsulamento de Rivastigmina em Nanopartículas Poliméricas</i>	26
3.4. <i>Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas</i>	32
3.4.1. <i>Adsorção não Específica</i>	34
3.4.2. <i>Adsorção por Ligação Covalente</i>	34
3.5. <i>Liberação de Fármacos e Modelos Cinéticos</i>	37
3.6. <i>Estudos in vitro para Avaliação de Biocompatibilidade</i>	40
3.7. <i>Comentários Finais</i>	42
Capítulo IV	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. <i>Materiais</i>	43
4.2. <i>Métodos</i>	46
4.2.1. <i>Reação de Polimerização em Miniemulsão</i>	46
4.2.2. <i>Ensaio de Funcionalização de Copolímeros com Lisina e TAT</i>	52
4.2.3. <i>Caracterização das Nanopartículas</i>	54
4.2.4. <i>Ensaio de Liberação</i>	58

4.2.5. <i>Ensaio de Citotoxicidade e Permeabilidade Celular</i>	59
Capítulo V	63
RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
5.1. <i>Preparo de Nanopartículas</i>	63
5.1.1. <i>Conversão</i>	63
5.1.2. <i>Diâmetro de Partícula e Potencial Zeta</i>	66
5.1.3. <i>Massa Molar e Estrutura Química</i>	69
5.2. <i>Encapsulamento de 0,5 %m/m de Fármaco</i>	75
5.2.1. <i>Conversão</i>	75
5.2.2. <i>Diâmetro médio de Partículas e Potencial Zeta</i>	77
5.2.3. <i>Massa Molar e Estrutura Química</i>	79
5.2.4. <i>Eficiência de Encapsulamento</i>	84
5.3. <i>Funcionalização com Lisina e TAT</i>	86
5.3.1. <i>Estrutura Química de Nanopartículas Funcionalizadas</i>	86
5.3.2. <i>Eficiência de Funcionalização</i>	88
5.4. <i>Aumento de Percentual Mássico de Fármaco</i>	90
5.4.1. <i>Conversão</i>	90
5.4.2. <i>Diâmetro de Partícula e Potencial Zeta</i>	92
5.4.3. <i>Eficiência de Encapsulamento</i>	94
5.5. <i>Funcionalização de Copolímeros com Lisina</i>	96
5.5.1. <i>Eficiência de Funcionalização</i>	96
5.6. <i>Ensaio de Liberação</i>	98
5.7. <i>Estudos in vitro</i>	100
5.7.1. <i>Citotoxicidade das Nanopartículas</i>	100
5.7.2. <i>Ensaio Transwell</i>	103
Capítulo VI	106
CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
6.1. <i>Sugestões</i>	108
Capítulo VII.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXO A – QUANTIFICAÇÃO DE RIVASTIGMINA	117
ANEXO B – QUANTIFICAÇÃO DE LISINA E TAT	118
ANEXO C – QUANTIFICAÇÃO DE LISINA E TAT	119
Novo Reagente	119
ANEXO D – QUANTIFICAÇÃO DE RIVASTIGMINA POR HPLC	120

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura III - 1. Fórmulas estruturais dos princípios ativos de inibidores de acetilcolinesterase: A) donepezil; B) galantamina e C) tartarato de rivastigmina.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura III - 2. Tipos de nanopartículas comumente utilizadas como sistemas carreadores de ativos (adaptado de FONSECA-SANTOS et al., 2015).....</i>	<i>13</i>
<i>Figura III - 3. Esquema da estrutura da BHE em organismos saudáveis (adaptado de CHEN; LIU, 2012).</i>	<i>15</i>
<i>Figura III - 4. Principais mecanismos de transporte pela BHE. Rotas de “a” a “f” são usadas para moléculas e solutos, enquanto a rota “g” utiliza células imunológicas (adaptado de CHEN; LIU, 2012).....</i>	<i>17</i>
<i>Figura III - 5. Principais características de nanopartículas que afetam o transporte pela BHE (adaptado de SARAIVA et al., 2016).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura III - 6. Esquema representativo da polimerização em miniemulsão (adaptado de ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura III - 7. Fórmula estrutural da rivastigmina base livre.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura III - 8. Representação esquemática de alguns ligantes utilizados para funcionalização de partículas voltadas à entrega sítio específica no SNC (adaptado de Tosi et al., 2016). Sendo mAB: anticorpo de receptor de insulina, TfR: receptor de transferrina, InsR: receptor de insulina, TAT: peptídeo trans-ativador de transcrição, Tf: transferrina, Ins: insulina, Lep: leptina, PS-80: polissorbato 80, PEG:polietileno glicol e BSA: albumina de soro bovino.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura III - 9. Mecanismos mais comuns para imobilização de compostos em superfícies poliméricas (adaptado de Goddard e Hotchkiss, 2007).</i>	<i>33</i>
<i>Figura III - 10. Formação de bioconjugação com o agente de reticulação EDC (Campos-Ramos, 2016).....</i>	<i>36</i>
<i>Figura III - 11. Comparação da concentração de fármaco na circulação sanguínea de fármacos rapidamente adsorvidos e eliminados (curva pontilhada) e de cinética de ordem zero de liberação (curva ponto-traço). Deseja-se manter a concentração do ativo na “janela terapêutica”; ou seja, abaixo da concentração mínima de toxicidade (CMT) e acima da mínima efetiva (CME) (adaptado de FALLIS, 2013).....</i>	<i>37</i>

<i>Figura IV - 1. Sistema de sonicação utilizado.</i>	47
<i>Figura IV - 2. Minirreator de polimerização utilizado nos ensaios, à esquerda. Esquematização do conjunto de controles utilizados, à direita.</i>	47
<i>Figura IV - 3. Estrutura esperada do copolímero P(MMA-co-AA).</i>	48
<i>Figura IV - 4. Procedimento experimental adotado para a funcionalização de nanopartículas.</i>	53
<i>Figura IV - 5. Procedimento experimental usado para o ensaio de citotoxicidade com células Caco-2.</i>	61
<i>Figura V - 1. Conversão da reação de polimerização via miniemulsão para obtenção de PMMA e copolímeros.</i>	64
<i>Figura V - 2. Detalhe da aglomeração formada na reação de copolimerização P(MMA-co-AA)15%.</i>	65
<i>Figura V - 3. Evolução das distribuições de diâmetros de partícula para PMMA e copolímeros.</i>	67
<i>Figura V - 4. Distribuições de massas molares para PMMA e copolímeros.</i>	70
<i>Figura V - 5. Espectros de FTIR obtidos para os polímeros produzidos; (A), comparação gráfica PMMA x P(MMA-co-AA) 7,5% (B), comparação gráfica PMMA x P(MMA-co-AA) 10% (C) e comparação gráfica PMMA x P(MMA-co-AA) 12% (D).</i>	71
<i>Figura V - 6 . Espectros de RMN obtidos para PMMA (A), P(MMA-co-AA) 7,5% (B), P(MMA-co-AA) 10% (C) e P(MMA-co-AA) 12% (D).</i>	73
<i>Figura V - 7. Comparativo das miniemulsões obtidas após etapa de sonicação com PMMA puro (A) e com PMMA + 0,5%R (B).</i>	75
<i>Figura V - 8. Evolução de conversão nas reações de PMMA puro e PMMA + 0,5%R.</i>	76
<i>Figura V - 9. Conversão para 10%AA e 12%AA com 0,5 %m/m de fármaco.</i>	76
<i>Figura V - 10. Distribuições de diâmetros de partícula para reações que visavam ao encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco.</i>	78
<i>Figura V - 11. Distribuições de massas molares para PMMA e nanopartículas contendo 0,5 %m/m de fármaco.</i>	80
<i>Figura V - 12. Espectros de FTIR obtidos para PMMA, copolímeros e nanopartículas produzidas com 0,5 %m/m R (A), comparação gráfica PMMA x PMMA +0,5%R (B), comparação gráfica P(MMA-co-AA)10% x P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R (C) e comparação gráfica P(MMA-co-AA)12% x P(MMA-co-AA)12% + 0,5%(D).</i>	81

<i>Figura V - 13. Espectro RMN obtido para PMMA (A), PMMA +0,5 %R (B), P(MMA-co-AA) 10% (C) e P(MMA-co-AA) 10% + 0,5%R (D).</i>	83
<i>Figura V - 14. Espectros de FTIR obtidos para nanopartículas produzidas com 10 %m/m e 12 %m/m de AA na presença e ausência de 0,5 %m/m de fármaco e funcionalizadas com lisina.</i>	87
<i>Figura V - 15. Espectros de FTIR obtidos para nanopartículas produzidas com 12 %m/m de AA na presença e ausência de 0,5 %m/m de fármaco e funcionalizadas com TAT.</i>	88
<i>Figura V - 16. Agregados poliméricos observados na reação P(MMA-co-AA)10% +1,5%R. Isto também foi observado nas reações P(MMA-co-AA)12% +0,5%R e P(MMA-co-AA) 7,5% +2%R.</i>	91
<i>Figura V - 17. Perfis de conversão das reações de polimerização em miniemulsão conduzidas com 1 %m/m e 1,5 %m/m de rivastigmina.</i>	91
<i>Figura V - 18. Distribuições de diâmetros de partícula para reações produzidas com 1 %m/m e 1,5 %m/m de rivastigmina.</i>	93
<i>Figura V - 19. Eficiências de encapsulamento para todas as nanopartículas produzidas na presença de fármaco.</i>	95
<i>Figura V - 20. Eficiências de funcionalização de lisina para PMMA e copolímeros produzidos com 7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m de ácido acrílico.</i>	97
<i>Figura V - 21. Cromatogramas obtidos durante o teste de liberação após 0 min (A), 5 min (B) e 24 horas (C) do início do experimento.</i>	98
<i>Figura V - 22. Valores de CC50 encontrados para os látices testados com margem de erro para 95% de confiança.</i>	101
<i>Figura V - 23. Micrografias obtidas após realização do teste Transwell para controle celular (A), teste com P(MMA-co-AA) 7,5% (B), P(MMA-co-AA) 7,5% +1,5%R (C) e controle positivo (D).</i>	103

<i>Figura A - 1. Espectros de soluções aquosas de rivastigmina base livre com diferentes concentrações (mg/mL).</i>	117
<i>Figura A - 2. Curva padrão de calibração de rivastigmina base livre em 263 nm.</i>	117
<i>Figura B - 1. Curva padrão obtida para determinação de lisina em 340 nm.</i>	118
<i>Figura B - 2. Curva padrão obtida de BSA para determinação de TAT em 595 nm.</i>	118
<i>Figura C - 1. Curva padrão obtida para determinação de lisina com novo reagente em 340 nm.</i>	119
<i>Figura C - 2. Curva padrão obtida de BSA para determinação de TAT com novo reagente em 595 nm.</i>	119
<i>Figura D - 1. Cromatógrafos obtidos para curva padrão de quantificação de rivastigmina base livre em HPLC. (A) 0,0025 mg/mL; (B) 0,05 mg/mL.</i>	120
<i>Figura D - 2. Curva padrão de calibração de rivastigmina base livre em HPLC.</i>	121

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela III - 1. Diferentes tipos de CPPs. A sequência está relacionada ao seguinte código: K—lisina; L— leucina; A—alanina; R—arginina; Q—glutamina; I—isoleucina; W—triptofano; F— fenilalanina; N— asparagina;M—methionina; G—glicina; S—serina; T—treonina (adaptado de CHEN; LIU;, 2012).</i>	18
<i>Tabela III - 2. Resumo dos principais achados na literatura para encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas poliméricas.</i>	31
<i>Tabela III - 3. Principais modelos matemáticos empíricos descritivos da cinética de liberação, em que k é a constante cinética do modelo, Q é a fração de fármaco liberada no tempo t e Q_0 é a quantidade inicial do fármaco.</i>	38
<i>Tabela IV - 1. Composições do meio reacional usadas para conduzir as polimerizações em miniemulsão de PMMA e copolímeros.</i>	49
<i>Tabela IV - 2. Composições de meio reacional nas polimerizações em miniemulsão contendo 0,5 %m/m de fármaco.</i>	50
<i>Tabela IV - 3. Composição de meio reacional para investigação do aumento do percentual mássico de fármaco encapsulado.</i>	51
<i>Tabela V - 1. Diâmetro médio de partículas e potencial zeta obtidos para PMMA e copolímeros.</i>	68
<i>Tabela V - 2. Massas molares médias das nanopartículas produzidas.</i>	70
<i>Tabela V - 3. Diâmetro médio de partículas e potencial zeta obtidos nos produtos resultantes do encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco.</i>	79
<i>Tabela V - 4. Massas molares médias das nanopartículas de PMMA e das amostras contendo 0,5 %m/m de fármaco.</i>	80
<i>Tabela V - 5. Eficiências de encapsulamento e massas de rivastigmina encapsuladas para PMMA +0,5%R, P(MMA-co-AA)10% +0,5%R e P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R.</i>	85
<i>Tabela V - 6. Eficiências de funcionalização de lisina e TAT em copolímeros preparados com 10 %m/m e 12 %m/m de AA na presença ou ausência de 0,5 %m/m de rivastigmina.</i>	89
<i>Tabela V - 7. Diâmetros médios de partículas e potencial zeta obtidos após encapsulamento de 1 %m/m e 1,5 %m/m de fármaco.</i>	92

<i>Tabela V - 8. Eficiências de encapsulamento e massas de rivastigmina encapsuladas nas reações de encapsulamento.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabela V - 9. Eficiências de funcionalização de lisina em PMMA e copolímeros preparados com 7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m de ácido acrílico.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabela V - 10. Valores CC50 obtidos para as nanopartículas testadas em células Caco-2.</i>	<i>100</i>
<i>Tabela V - 11. Passagem percentual das nanopartículas em ensaio Transwell.....</i>	<i>104</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido acrílico
ABZ	2-Aminobenzamida
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
CPP	<i>Cell penetrating peptides</i> (peptídeo célula-penetrante)
DA	Doença de Alzheimer
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fase aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FO	Fase orgânica
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
IEAc	Inibidores enzimáticos de acetilcolinesterases
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KPS	Persulfato de potássio
MMA	Metacrilato de metila
NHS	N-hidroxi-succinimida
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	Orto-ftaldialdeído
P(MMA-co-AA)	Poli(metil metacrilato co ácido acrílico)
P(MMA-co-AA)X%	Copolímero produzido com X% em massa de ácido acrílico no meio reacional
P(MMA-co-AA)X% + Y%R	Copolímero produzido com X% em massa de ácido acrílico e Y% em massa de rivastigmina base livre no meio reacional
PA	Placas amilóides
PACA	Poli(cianoacrilato de alquila)

PBCA	Poli(cianoacrilato de butila)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PDI	Índice de polidispersão
PDMAEMA	Poli(metacrilato de dimetilaminoetila)
PEG	Polietileno glicol
PEI	Polietilenimina
PHM	Poli(metacrilato de hidroxietilaspartamida)
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático-co- ácido glicólico)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PVA	Poli(álcool vínlico)
RBL	Rivastigmina base livre
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
TAT	Trans-ativador de transcrição
THF	Tetrahidrofurano
TR	Tartarato de rivastigmina

Capítulo I

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença terminal reconhecida como um dos maiores desafios na área da medicina. Ela é vista como uma mazela silenciosa, pois se manifesta somente após um longo período de neurodegeneração, não possuindo ainda um tratamento eficaz (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016). O maior fator de risco associado ao desenvolvimento da DA é o envelhecimento, sendo que há maiores chances de evolução da doença à medida que os indivíduos envelhecem. Diante do quadro social atual, com redução global da fertilidade e aumento da expectativa de vida, espera-se que o número de portadores de DA aumente com o envelhecimento continuado da população. (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016; SCAZUFCA *et al.*, 2002). Este fato apresenta importantes impactos socioeconômicos, tendo em vista o aumento de custos com cuidados hospitalares e cuidadores. Nos Estados Unidos da América, cerca de 5 milhões de pessoas sofrem de DA, sendo que em 2016 US\$236 bilhões foram gastos com portadores de demências (HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016). No Brasil, não há dados estatísticos da incidência de DA, porém, a literatura mostra uma realidade semelhante à mundial. HERRERA *et al.*(2002) encontraram a prevalência de 4,9% de DA em uma cidade urbana de São Paulo e NITRINI *et al.* (2004) obtiveram uma taxa de incidência anual de DA de 7,7 casos por 1000 habitantes de mais de 65 anos (HERRERA *et al.*, 2002; NITRINI *et al.*, 2004).

O processo neurodegenerativo da DA é caracterizado, principalmente, pela perda de neurônios, diminuindo os níveis do neurotransmissor acetilcolina no córtex cerebral (MULLER, 2007). Os fármacos aprovados para o tratamento sintomático de DA são inibidores de colinesterases, que permitem corrigir a insuficiência do neurotransmissor, atenuando os efeitos da doença e melhorando o estilo de vida do paciente portador. Dentre os fármacos utilizados estão o donepezil, a galantamina e a rivastigmina, utilizados na fase inicial e moderada da doença. A memantina, que está baseado em outro mecanismo de ação, permite o uso em estágios mais graves da doença (MULLER, 2007; YIANNPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013) .

Com o avanço da DA, a enzima butirilcolinesterase adquire também a função de metabolizar a acetilcolina. Entretanto, dentre os fármacos já utilizados, somente a rivastigmina consegue inibir tanto a colinesterase quanto a butirilcolinesterase. Como o mecanismo de inibição ocorre por meio da formação de ligações covalentes, o fármaco apresenta possui atuação de média a longa duração, não sendo metabolizado pelo fígado (MULLER, 2007). Diante das muitas vantagens, a rivastigmina destaca-se no tratamento farmacológico de DA.

Embora os fármacos aprovados para tratamento sintomático da DA sejam eficientes, as estratégias convencionais de administração resultam em baixa solubilidade nos fluidos corporais, baixa biodisponibilidade e baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, onde está o foco de atuação. Tendo isto em vista, pesquisas na área de nanofármacos estão sendo desenvolvidas com o objetivo de otimizar a entrega dos princípios ativos, diminuindo os efeitos adversos e ampliando a biodisponibilidade (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; KREUTER, 2014). De acordo com a literatura, um fármaco pode ser eficientemente transportado no organismo caso esteja associado a nanoestruturas que possuam características sítio-específicas. Dessa forma, o ativo poderá ser eventualmente liberado dentro do cérebro com perfil de concentração e tempo adequados para garantir os efeitos terapêuticos relevantes desde que uma nanoestrutura conveniente seja desenvolvida (KREUTER, 2014).

Dentre os materiais utilizados para produção de nanopartículas, os polímeros merecem especial destaque. O polímero poli(metacrilato de metila) (PMMA), por exemplo, é um material biocompatível, amplamente utilizado em aplicações biomédicas nas áreas de cosmética, ortodontia, oftalmologia e ortopedia, além de não apresentar citotoxicidade (FEUSER *et al.*, 2014). Entretanto, as nanopartículas de PMMA não apresentam grupos funcionais para a realização de ligações covalentes e funcionalização do nanossistema. Dessa forma, é possível adicionar um comonômero funcional, o ácido acrílico, também biocompatível, com o objetivo de introduzir radicais ácido carboxílicos, visando a formação de ligação covalente com outras moléculas para facilitar o direcionamento para o cérebro. As nanopartículas assim sintetizadas devem ser capazes de passar pela barreira hematoencefálica sem as desvantagens de utilizar um mecanismo de transporte mediado por receptores como saturação de receptores e uso de ligantes não específicos.

Os grupos de pesquisas do Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) e do Laboratório de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT) do Programa de Engenharia Química (PEQ) já possuem experiência acumulada nos campos do encapsulamento de ativos em nanopartículas poliméricas e da funcionalização de suportes, com vários trabalhos publicados. FONSECA *et al.* (2013) estudaram o encapsulamento de praziquantel para o tratamento de esquistossomose; LORCA *et al.* (2012) e PAIVA, MELO e PINTO (2015) estudaram sistemas de nanoencapsulamento de filtros solares; e MOREIRA *et al.* (2014) empregaram polimerização em miniemulsão para encapsulamento de tamoxifeno para terapia de câncer de mama (FONSECA *et al.*, 2013; LORCA *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2014; PAIVA; MELO, P.; PINTO, 2016). SANTOS, HABERT e FERRAZ (2017) e NICOLLINI, FERRAZ e RESENDE (2016) utilizaram técnicas de imobilização de bioativos respectivamente em membranas poliméricas, para hemodiálise, e em nanofios de titanato, para aplicações em biossensores, (NICOLLINI; FERRAZ; RESENDE, 2016; SANTOS; HABERT; FERRAZ, 2017). Destaca-se ainda o trabalho de PEIXOTO *et al.* (2016), que utilizou diferentes copolímeros para inserção de grupos funcionais variados, visando à imobilização de proteínas (PEIXOTO *et al.*, 2016). Em particular, CAMPOS, FERRAZ e PINTO (2016) desenvolveram um copolímero à base de P(MMA-co-AA) funcionalizado para entrega sítio-dirigida (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016). Estes dois últimos trabalhos contribuíram significativamente para o desenvolvimento das metodologias aqui adotadas, permitindo a continuidade do estudo de desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos dirigidos ao sistema nervoso central.

Esta dissertação de mestrado está organizada em sete capítulos e quatro apêndices, em que a organização dos capítulos foi realizada de maneira cronológica aos experimentos realizados. Após esta breve introdução, o Capítulo II apresenta os objetivos gerais e específicos do estudo. No Capítulo III está descrita a revisão da literatura utilizada para contextualização, motivação e justificativa para o desenvolvimento da tese. No Capítulo IV estão dispostos os materiais e as metodologias aplicadas no decorrer da dissertação.

A Seção 4.2.1. descreve as reações de polimerização e copolimerização do monômero metacrilato de metila (MMA) com ácido acrílico (AA) via miniemulsão assim como as reações de encapsulamento *in situ* do fármaco rivastigmina base livre. A Seção 4.2.2. apresenta as metodologias adotadas para os ensaios de funcionalização dos copolímeros sintetizados via adsorção química com a molécula modelo lisina e com o peptídeo de internalização celular trans-ativador de transcrição (TAT). Na Seção 4.2.3,

propõe-se um estudo de liberação do fármaco encapsulado em condições controladas *in vitro*. A Seção 4.2.4 apresenta os ensaios biológicos, também *in vitro*, realizados com culturas celulares animais visando à determinação da citotoxicidade do nanomaterial e à avaliação da sua capacidade de permeabilidade. Finalmente, a Seção 4.2.5. descreve os métodos analíticos utilizados para caracterização do material polimérico produzido.

No Capítulo V, são discutidos os resultados obtidos, ressaltando-se as contribuições do trabalho. No Capítulo VI encontram-se as conclusões assim como sugestões de estudos posteriores. Finalmente, no Capítulo VII está a lista de referências bibliográficas consultadas ao longo do documento. Os ANEXOS do final do documento apresentam dados experimentais e equações matemáticas de curvas padrão construídas no estudo.

Essa pesquisa foi integralmente realizada nos laboratórios EngePol e GRIFIT do Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto de Alberto Luiz Coimbra (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises de ressonância magnética nuclear foram efetuadas no Laboratório Multiusuário de RMN de sólidos do Instituto de Química/UFRJ. A esterilização do material foi realizada no Laboratório de Bioprocessos/PEQ/COPPE/UFRJ. Finalmente, os ensaios com culturas celulares para análises de citotoxicidade e permeabilidade celular foram efetuados no Laboratório de Ultraestrutura Celular no Instituto Oswaldo Cruz na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Capítulo II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo principal promover o encapsulamento de rivastigmina base livre em nanopartículas de poli(metacrilato de metila – co – ácido acrílico) funcionalizadas visando ao transporte sítio-dirigido do fármaco através da barreira hemotencefálica.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- realizar ensaios de polimerização, utilizando a técnica de polimerização em miniemulsão de MMA;
- obter nanopartículas poliméricas com diâmetros médios na faixa de 20-100 nm, visando a atender as normas de segurança para usos de fins farmacêuticos;
- estudar as condições e a eficiência do processo de encapsulamento do fármaco rivastigmina base livre em nanopartículas poliméricas baseadas em PMMA;
- verificar a eficiência do processo de funcionalização das nanopartículas preparadas com o peptídeo TAT;
- avaliar o perfil de liberação do fármaco encapsulado *in vitro*;
- avaliar a citotoxicidade e a capacidade de permeabilidade da nanopartícula sintetizada utilizando um modelo celular animal.

Capítulo III

REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Doenças Neurodegenerativas

Doença neurodegenerativa é um termo genérico utilizado para caracterizar condições em que há perda progressiva da estrutura ou da função de neurônios. Neurônios são células nervosas presentes no cérebro e na medula espinhal, que tem a função de transmitir sinais nervosos. Dessa forma, a neurodegeneração provoca importantes efeitos no corpo humano, podendo afetar o sistema motor (provocando o transtorno neurológico chamado de ataxia) e/ou o funcionamento mental (demências) originando doenças incuráveis (KHANAM *et al.*, 2016).

A degeneração progressiva e a morte de células neurais podem ocorrer em níveis diferentes, variando de molecular a sistêmica. Algumas possíveis causas observadas são danos às organelas neurais por proteínas nocivas, disfunções mitocondriais, estresse oxidativo e desenvolvimento de axônios¹ defeituosos (KHANAM *et al.*, 2016). A maioria das doenças provocadas por neurodegeneração apresentam início tardio, quando os neurônios perdem gradualmente a função, à medida que a doença progride com a idade do portador. Assim, o maior fator de risco associado a essas doenças é o envelhecimento (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016; KHANAM *et al.*, 2016; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

Algumas doenças neurodegenerativas típicas são a esclerose lateral amiotrófica, as doenças do neurônio motor, a ataxia espinocerebelar, a atrofia muscular espinal e as doenças de Huntington, Prion, Parkinson e Alzheimer (KHANAM *et al.*, 2016). Esta última é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns, representando cerca de 80% dos casos de demência em idosos no mundo (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

¹ Axônio é a parte do neurônio responsável pela condução dos impulsos elétricos.

3.1.1. Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda neural em regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas como o córtex cerebral², o hipocampo³, o córtex entorrinal⁴ e a região estriada ventral⁵ (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015). A privação dos neurônios acarreta a perda progressiva de capacidades mentais, comportamentais, de aprendizado e declínio funcional do portador (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015). É a quinta principal causa de morte entre idosos com a impressionante estimativa de 115 milhões de portadores em 2050 (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016; MULLANE; WILLIAMS, 2013).

Além da carga emocional para os familiares, o tratamento de DA possui um impacto econômico muito alto, relacionado aos custos com cuidados hospitalares e uso de mão de obra qualificada (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016). WIMO *et al.* (2016) estimaram que os custos mundiais associados aos tratamentos de demências foram iguais a US\$ 818 bilhões em 2015, 35% acima dos valores do ano de 2010. Espera-se que estes valores cheguem a US\$ 1 trilhão em 2018 (PRINCE *et al.*, 2016; WIMO *et al.*, 2016). Levando-se em conta que a DA responde pela maioria dos casos de demência, grande parte desses custos está associada ao tratamento da DA, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para essa doença.

A DA é histopatologicamente caracterizada pela presença de placas amilóides (PA) e por emaranhados neurofibrilares em células neurais (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; EFTEKHARZADEH; HYMAN; WEGMANN, 2016; GALIMBERTI; SCARPINI, 2010; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013). As PA são acúmulos proteicos nos neurônios de peptídeos β -amilóide, originados a partir da clivagem da proteína precursora amiloida. A aglutinação elevada produz fibras amilóides insolúveis, que contribuem com a morte neuronal. A deposição de placas de β -amilóide é intensificada em portadores com mutações específicas, sendo que a complexação com metais, como cobre e zinco, contribui para a elevação da toxicidade neural (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; HICKMAN; FAUSTIN; WISNIEWSKI, 2016).

² Córtex cerebral é a camada mais externa do cérebro.

³ Hipocampo é a região cerebral associada com a memória e navegação espacial.

⁴ Córtex entorrinal é uma região do cérebro adjacente ao hipocampo.

⁵ Estriado ventral é um dos núcleos que compõem o diencéfalo e se liga ao córtex.

Os emaranhados neurofibrilares são depósitos intracelulares de proteínas tau, que são naturalmente presentes para estabilização de microtúbulos neurais. Em um organismo saudável, a proteína tau está distribuída ao longo dos axônios, com a função de promover a organização estrutural e funcional da célula. Em portadores de DA, ocorre fosforilação anormal da proteína tau, gerando fibrilas insolúveis estáveis que formam emaranhados neurofibrilares, provocando a desorganização do citoesqueleto neural. Algumas mutações também podem contribuir com a maior propensão para agregação de proteína tau. Esta modificação estrutural impacta o fluxo de proteínas funcionais, resultando na perda ou diminuição do transporte de sinais entre as estruturas do neurônio (EFTEKHARZADEH; HYMAN; WEGMANN, 2016; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; HOLTZMAN *et al.*, 2016).

As alterações estruturais presentes em portadores de DA podem ser utilizadas para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, controle e prevenção da doença, levando à criação de novas estratégias terapêuticas. Algumas técnicas de imagem, como tomografia computadorizada, ressonância magnética, tomografia de emissão de fóton único e tomografia de emissão de pósitrons, podem ser utilizadas para conduzir exames auxiliares com o objetivo de detectar lesões, atrofia cortical e cerebral e progressão de atrofia, contribuindo com o diagnóstico da doença (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; GALIMBERTI; SCARPINI, 2010; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013).

Vários estudos prévios utilizaram a PA e proteínas tau como alvo de marcadores diagnósticos ou de novas terapias sítio-dirigidas. KULKARNI *et al.* (2010) encapsularam o fármaco clioquinol, que apresenta afinidade com PA, marcado com iodo radioativo em nanopartículas poliméricas de poli(cianoacrilato de butila) (PBCA) para detecção em exames de imagem (KULKARNI *et al.*, 2010). DAGE *et al.* (2016) utilizaram técnicas de imunossaios para detecção de níveis de proteína tau no plasma sanguíneo, como potencial biomarcador para análise pré-clínica de DA (DAGE *et al.*, 2016). ZHENG *et al.* (2016) utilizaram nanopartículas poliméricas de metacrilato de dimetilaminoetila (PDMAEMA), conjugada com peptídeos, para permitir o carregamento e internalização de ácido ribonucleico (RNA) objetivando reduzir o aparecimento de PA (ZHENG *et al.*, 2016).

Apesar de existirem vários mecanismos complexos e ainda desconhecidos envolvidos na gênese e nos processos de progressão associados à doença, os avanços tecnológicos têm contribuído para melhor compreensão molecular. Isto permitirá

eventualmente o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico mais precisas e de estratégias terapêuticas mais eficazes (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015)

3.1.2. Fármacos para tratamento da Doença de Alzheimer

Atualmente os fármacos utilizados para tratamento de DA proporcionam apenas o tratamento sintomático da doença não sendo capazes de impedir o seu desenvolvimento. Tendo em vista a evolução do conhecimento adquirido e a complexidade da patogênese da DA, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem reestruturação e modificação da doença. Os principais avanços na área são associados a terapias baseadas em placas amilóides e na proteína tau, ao uso de moduladores de neurotransmissões e à redução do estresse oxidativo. Terapias alternativas já foram investigadas em estudos pré-clínicos, porém não levaram a resultados satisfatórios em cenários clínicos. Os únicos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América são os inibidores de colinesterase e a Memantina (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; GALIMBERTI; SCARPINI, 2010; MULLANE; WILLIAMS, 2013; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013).

O processo neurodegenerativo da DA afeta principalmente o sistema de neurônios colinérgicos⁶ reduzindo os níveis do neurotransmissor acetilcolina no córtex cerebral. Esta disfunção pode ocorrer em vários níveis por meio da diminuição de acetiltransferase, redução de absorção e síntese de acetilcolina e alteração dos níveis de receptores de acetilcolina. Naturalmente, a enzima colinesterase é responsável por regular os níveis do neurotransmissor para o desenvolvimento de atividades cotidianas. Assim, em um portador de DA, os níveis de acetilcolina são reduzidos ainda mais, provocando perda de memória e redução de processos cognitivos (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; MULLER, 2007). Estudos mostram que a disfunção dos sistemas de neurotransmissões pode levar ao desenvolvimento da DA. Dessa forma, a modulação dos níveis de neurotransmissores por meio do uso de fármacos surge como a alternativa favorável para proporcionar melhorias sintomáticas de portadores (ANAND; GILL; MAHDI, 2014).

Os inibidores de acetilcolinesterases (IEAc) aprovados permitem corrigir a insuficiência do neurotransmissor, inibindo a ação da enzima neural acetilcolinesterase. Dessa forma, consegue-se atenuar os efeitos da doença e melhorar o estilo de vida do

⁶ Neurônios colinérgicos são neurônios que sintetizam e liberam acetilcolina.

paciente portador. Ensaios utilizando IEAc com portadores de DA indicaram melhoria clínica significativa nas funções cognitivas, retardo do declínio de funções motoras e melhorias nos sintomas comportamentais, em comparação com placebo (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; HANSEN *et al.*, 2008; MULLER, 2007). Dentre os fármacos usados, ilustrados na Figura III - 1, estão o donepezil, a galantamina e a rivastigmina, utilizados na fase inicial e moderada da doença, e a memantina que apresenta outro mecanismo de ação (receptor antagonista de N-metil-D- aspartato (NMDA)) permitindo o uso em estágios mais graves da doença (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; MULLER, 2007; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIU, 2013).

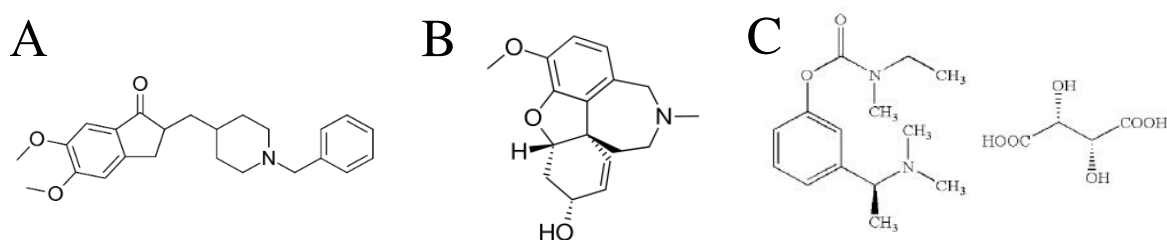


Figura III - 1. Fórmulas estruturais dos princípios ativos de inibidores de acetilcolinesterase: A) donepezil; B) galantamina e C) tartarato de rivastigmina.

Comparando-se os diferentes IEAc (donepezil, galantamina e rivastigmina), não é possível identificar evidência clara que indique diferença significativa nas eficiências de atuação (HANSEN *et al.*, 2008). Entretanto, os sistemas enzimáticos regulatórios de acetilcolina são compreendidos por duas enzimas: a acetilcolinesterase (em neurônios) e a butirilcolinesterase (em células gliais⁷) sendo que apenas a rivastigmina é capaz de atuar em ambas enzimas. Tendo em vista que, com o avanço da doença, a atividade da butirilcolinesterase aumenta em 40-90% e que o mecanismo de inibição da rivastigmina resulta da formação de ligações covalentes com a enzima, este fármaco destaca-se no tratamento farmacológico da DA (ANNICCHIARICO *et al.*, 2007; MULLER, 2007).

É importante ressaltar que o uso de IEAc está constantemente associado à incidência de vários efeitos adversos, como náuseas, vômito, diarreia, tontura e perda de peso (HANSEN *et al.*, 2008; MULLER, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes e que causem menos efeitos adversos constitui outra área de

⁷ Células gliais são células não neuronais do sistema nervoso central que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios.

destaque no campo de tratamento da DA. Normalmente, os IEAc são administrados oralmente; porém, sistemas de administração transdérmica já estão disponíveis, visando a manter o efeito prolongado com flutuações mínimas nas concentrações plasmáticas de fármaco e redução de efeitos no trato gastrointestinal (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; MULLER, 2007). Outra estratégia em desenvolvimento é a utilização de sistemas nanotecnológicos para otimização da entrega de fármacos, redução de efeitos adversos e aumento de biodisponibilidade (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; JOSHI; CHAVHAN; SAWANT, 2010; KREUTER, 2014; NAGPAL; SINGH, S. K.; MISHRA, 2013).

Por todo o exposto, observa-se que o desenvolvimento de fármacos modificadores da DA constitui um campo de estudos de relevância mundial, já que poderá reduzir e abrandar as etapas patológicas moleculares que conduzem à neurodegeneração e, conseqüentemente, à demência. No entanto, os tratamentos disponíveis já utilizados (IEAc e memantina) formam terapias de benefício clínico comprovado e de ação consistente para a cognição e capacidade funcional do portador (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIU, 2013).

3.2. Sistemas de Liberação

A eficiência de um medicamento está diretamente relacionada à chegada do princípio ativo no sítio de ação em quantidades adequadas para garantir os efeitos desejados. A busca de uma cinética de liberação de fármaco mais apropriada envolve tomada de decisões complexas e interdependentes, englobando conhecimentos específicos relacionados à físico-química do medicamento e do material de administração, como solubilidade, permeabilidade, taxas de distribuição do fármaco no tecido alvo e interações específicas com receptores e sistemas transportadores. Além disso, a escolha de uma via de aplicação associada a um mecanismo de liberação mais propício ao caso são de extrema importância para garantir melhor controle do efeito do fármaco considerado no organismo (FALLIS, 2013; PARK, 2014).

Nesse contexto, sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido desenvolvidos com o objetivo de aperfeiçoar o seu mecanismo de ação por meio da melhoria na distribuição temporal e espacial do fármaco no organismo. Adicionalmente, estes sistemas são capazes de proteger o fármaco da degradação ou completa eliminação pelo organismo, favorecendo o transporte por barreiras fisiológicas e conduzindo o ativo

ao local de ação, minimizando efeitos adversos em outras regiões (FALLIS, 2013).

Algumas limitações dos métodos tradicionais de administração, como baixa absorção, hidrofobicidade e fraca solubilidade, podem ser solucionadas por meio do encapsulamento de fármacos em nanopartículas ou nanodispositivos. Segundo FONSECA-SANTOS *et al.* (2015), esta nova conformação permite diminuir a toxicidade do fármaco, melhorando a farmacocinética e a farmacodinâmica do formulação (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015). Outra vantagem desses sistemas é a possibilidade de incorporação de ligantes específicos na superfície das nanoestruturas, permitindo o direcionamento e a ligação específica a determinados tipos de células promovendo a liberação do fármaco somente nestes locais. Dessa forma, nanocarreadores permitem aumentar o tempo de residência do fármaco, promovendo maior efeito de permeação e retenção do fármaco (FALLIS, 2013). Alguns exemplos de nanocarreadores são micro e nanoemulsões, lipossomas, dendrímeros, micelas poliméricas, nanopartículas lipídicas e poliméricas, como discutido a seguir.

3.2.1. Direcionamento de Fármacos para o Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) apresenta barreiras fisiológicas para proteção contra agentes patógenos, moléculas neurotóxicas e células sanguíneas circulantes. Existem diferentes estruturas de proteção e as altas seletividades dessas estruturas são responsáveis pela manutenção da homeostase⁸ e das taxas de entrada e saída de componentes específicos. Assim, a passagem por estas barreiras naturais constitui um grande desafio para o tratamento de doenças associadas a sítios de ação presentes no SNC, como no caso de doenças de Parkinson e Alzheimer (SARAIVA *et al.*, 2016).

Administrações intravenosas de formulações de nanopartículas em animais saudáveis comprovaram a eficácia da passagem desses nanossistemas para o cérebro. Vários estudos investigaram a aplicação de nanopartículas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, com o objetivo de melhorar o transporte de fármacos através das barreiras seletivas. Estes nanocarreadores, ilustrados na Figura III- 2, são caracterizados como sistemas coloidais de origem natural ou sintética, com tamanhos característicos variando entre 1 a 1000 nm (KREUTER, 2014; SARAIVA *et al.*, 2016).

⁸ Homeostase é a condição físico química de estabilidade que o organismo necessita para realizar adequadamente as suas funções vitais.

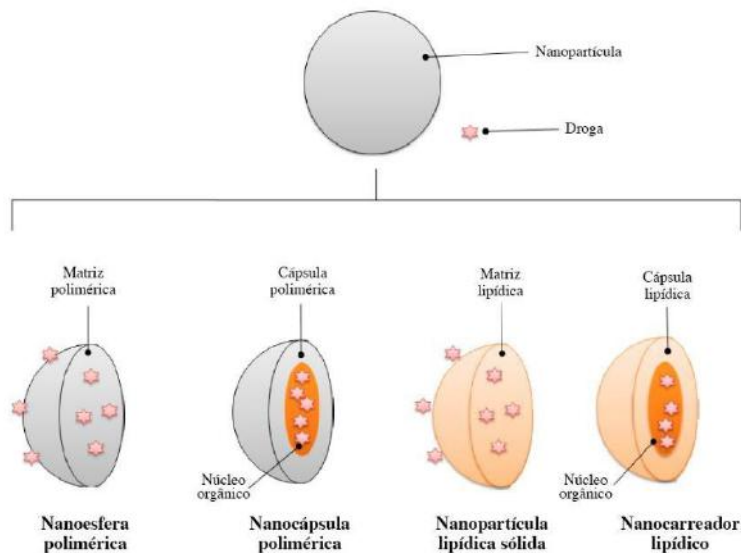


Figura III - 2. Tipos de nanopartículas comumente utilizadas como sistemas carreadores de ativos (adaptado de FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são estruturas esféricas de diâmetros médios variáveis entre 50 e 1000 nm. O sistema é caracterizado pela dispersão de um núcleo lipídico, contendo o fármaco, em meio aquoso, utilizando um emulsificante. Existem diversos métodos de fabricação de NLS; porém, os principais métodos são a homogeneização de alta pressão, a microemulsão, a evaporação de solventes, a dupla emulsão e a emulsificação e difusão de solvente (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016). YUSUF *et al.* (2013) utilizaram piperina encapsulada em NLS revestidas com polissorbato 80 em ratos com mal de Alzheimer induzido. Os resultados mostraram melhora cognitiva e as análises histopatológicas revelaram redução de placas amilóides, indicando a passagem das NLS pela barreira hematoencefálica (YUSUF *et al.*, 2013).

Os lipossomas são estruturas micrométricas ou nanométricas, de tamanho variável entre 50 e 450 nm, formadas por duas ou mais camadas lipídicas concêntricas e um núcleo aquoso. Lipossomas são capazes de reter tanto compostos hidrofílicos, no seu interior aquoso, quanto agentes hidrofóbicos, nas membranas lipídicas. Existem vários métodos de preparação de lipossomas e a escolha do método mais adequado depende das características físico-químicas finais desejadas das nanoestruturas, da toxicidade do fármaco, do meio de dispersão, dos custos e reprodutibilidade (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). YANG *et al.* (2013) encapsularam rivastigmina em lipossomas e em lipossomas modificados com peptídeos célula-penetrante, objetivando aperfeiçoar a distribuição do fármaco no cérebro em aplicações intranasais. Utilizando

ensaios *in vitro* com células microvasculares de camundongos, foi concluído que ambos os nanocarreadores avaliados, especialmente os modificados com peptídeos, conseguiram passar pela barreira fisiológica, garantindo a entrega sítio-dirigida do fármaco, sem causar efeitos adversos gastrointestinais (YANG *et al.*, 2013). Entretanto, os lipossomas podem apresentar algumas desvantagens como baixa eficiência de encapsulamento, baixa estabilidade (tendendo a aglomerar) e uso de solventes orgânicos agressivos durante a sua formulação (PAIVA; MELO; PINTO, 2016).

Estas desvantagens não são observadas em metodologias de nanoemulsão (PAIVA; MELO; PINTO, 2016). As nanoemulsões são dispersões de gotículas de tamanhos nanométricos (usualmente até 140 nm) formadas por um sistema aquoso-orgânico com auxílio de um agente surfactante (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015). Por serem termodinamicamente instáveis, para formar uma nanoemulsão deve ser aplicada energia ao sistema por meio de homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou sonificadores (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015). De acordo com PAIVA, MELO e PINTO (2016), o uso de polimerização em miniemulsão permite maior eficiência de encapsulamento e controle do tamanho da partícula resultando em maior estabilidade em comparação aos lipossomas (PAIVA; MELO; PINTO, 2016). MAHAJAN *et al.* (2014) estudaram a administração intranasal de uma nanoemulsão de saquinavir (antiviral utilizado no tratamento de AIDS) objetivando a entrega mais eficaz ao sistema nervoso central. O estudo *in vivo* em ratos permitiu concluir que o uso das nanoemulsões apresentou melhor biodistribuição e maior eficiência de direcionamento de fármaco (foram obtidas maiores concentrações do ativo no cérebro), comparativamente à administração intravenosa de uma suspensão do fármaco, demonstrando o grande potencial das nanoemulsões (MAHAJAN *et al.*, 2014).

Dentre os vários tipos de nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas apresentam-se como estratégia promissora e eficiente de veículos carreadores multivalentes para várias aplicações biomédicas. A principal vantagem dos sistemas baseados em polímeros é a alta versatilidade estrutural, proporcionando propriedades específicas para a entrega e encapsulamento de suas cargas. Além disso, dependendo das características químicas, estes nanocarreadores são capazes de provocar uma resposta particular a estímulos fisiológicos ou externos específicos, como pH, variação de temperatura, aplicação de campo magnético, presença de reações ou produtos enzimáticos e oxidativos, entre outros (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; SARAIVA *et al.*, 2016).

Nanocarreadores baseados em polímeros podem ser obtidos a partir de materiais poliméricos sintéticos ou naturais por diferentes métodos de preparo. A escolha da metodologia mais adequada depende do objetivo terapêutico, sítio alvo e via de administração desejada. O transporte de fármacos pode ser feito por meio da adsorção, encapsulamento ou ligação covalente com a nanopartícula. Além disso, a inserção de compostos funcionais na superfície permite, além do direcionamento a sítios específicos, facilitar a difusão por meio de barreiras fisiológicas naturais, aumentando a densidade de fármaco no local de ação (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015). Tendo em vista a importância desses nanocarreadores e o crescente interesse na entrega de fármacos para o SNC, mais detalhes serão abordados nas próximas seções.

3.2.2. Barreira Hematoencefálica

As barreiras fisiológicas existentes no SNC são diferenciadas, de acordo com o seu grau de permeabilidade. Dentre elas, destaca-se a Barreira Hematoencefálica (BHE) por conta da longa extensão e alta seletividade. Ela é composta por células endoteliais conectadas por junções *tight*⁹ e junções aderentes¹⁰, pericitos¹¹, astrócitos¹² e microglias¹³. A Figura III- 3 esquematiza a composição da BHE (CHEN; LIU, 2012; SARAIVA *et al.*, 2016).

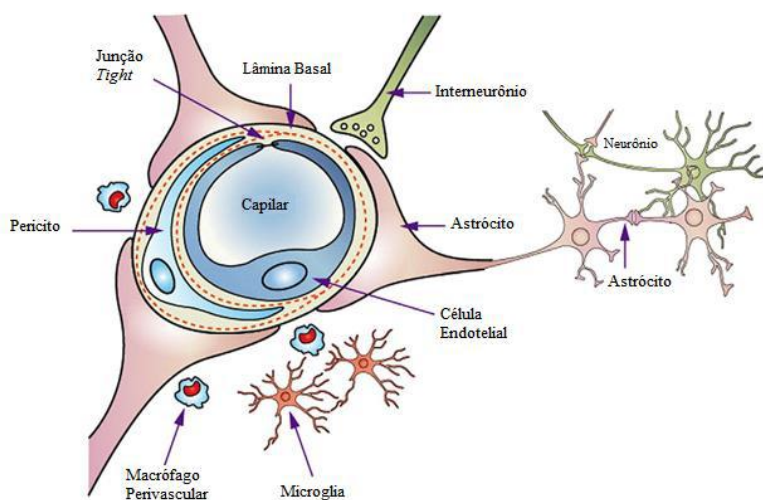


Figura III - 3. Esquema da estrutura da BHE em organismos saudáveis (adaptado de CHEN; LIU, 2012).

⁹ Junções *tight* são um tipo específico de junção celular de epitélios. Elas são responsáveis por prevenir o escape de íons, proteínas ou outras moléculas entre células adjacentes.

¹⁰ Junções aderentes são junções celulares a partir da ancoragem do citoesqueleto por meio de fila.

¹¹ Pericitos são células mesenquimais associadas a vasos sanguíneos, participando da regulação de fluxo sanguíneo.

¹² Astrócitos são as células gliais mais abundantes no sistema nervoso central responsáveis pela manutenção da estrutura e regulação de concentração de diversas substâncias e neurotransmissores.

¹³ Microglias são pequenas células não neurais que atuam no sistema imune do parênquima cerebral e medula espinhal.

Qualquer molécula administrada por via sanguínea para a entrada no parênquima cerebral¹⁴, tem o acesso limitado pela BHE. Dessa forma, a BHE é universalmente considerada como a barreira mais importante para o transporte de moléculas ao cérebro. Assim, levando-se em conta a importância desta barreira no transporte de fármacos para o SNC, entender os mecanismos envolvidos na passagem de elementos através da BHE apresenta suma importância para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes (CHEN; LIU, 2012; SARAIVA *et al.*, 2016).

Os principais mecanismos de passagem pela BHE estão ilustrados na Figura III- 4, sendo que as três vias principais de difusão são as difusões paracelular, transcelular e a transcitose. A primeira via é referente ao transporte de íons e solutos entre as células endoteliais e é dependente do gradiente de concentrações (III - 4a). O transporte transcelular é caracterizado pela passagem de lipídeos solúveis através das células da barreira, apresentando limitação de tamanho de até 500 Da (III - 4b). Para tamanhos superiores, como no caso de proteínas, são utilizados receptores específicos para moléculas lipofílicas e hidrofílicas (III - 4c). Finalmente, a transcitose ocorre por meio de invaginações celulares que englobam substratos, que são transportados para o interior ou exterior da região cerebral (III - 4f). Entretanto, deve-se considerar ainda a presença de bombas de efluxo (III - 4d), que garantem a expulsão de moléculas neurotóxicas lipossolúveis e de fármacos para a circulação sanguínea (CHEN; LIU, 2012; SARAIVA *et al.*, 2016).

KREUTER (2014) destacou que o mecanismo de transporte mais atuante na captação e deslocamento de nanopartículas é a transcitose mediada por receptor (III-4e) onde ocorre a entrada por endocitose dos nanocarreadores, seguida do transporte através das células endoteliais (KREUTER, 2014). Para que este tipo de mecanismo ocorra, as nanopartículas podem ser funcionalizadas com ligantes específicos ou encobertas por surfactantes, como o polissorbato 80, para criar interação com receptores superficiais, provocando a interiorização pela membrana plasmática e a consequente entrada e liberação das nanopartículas no interior celular (SARAIVA *et al.*, 2016).

¹⁴ Parênquima cerebral é o tecido do cérebro.

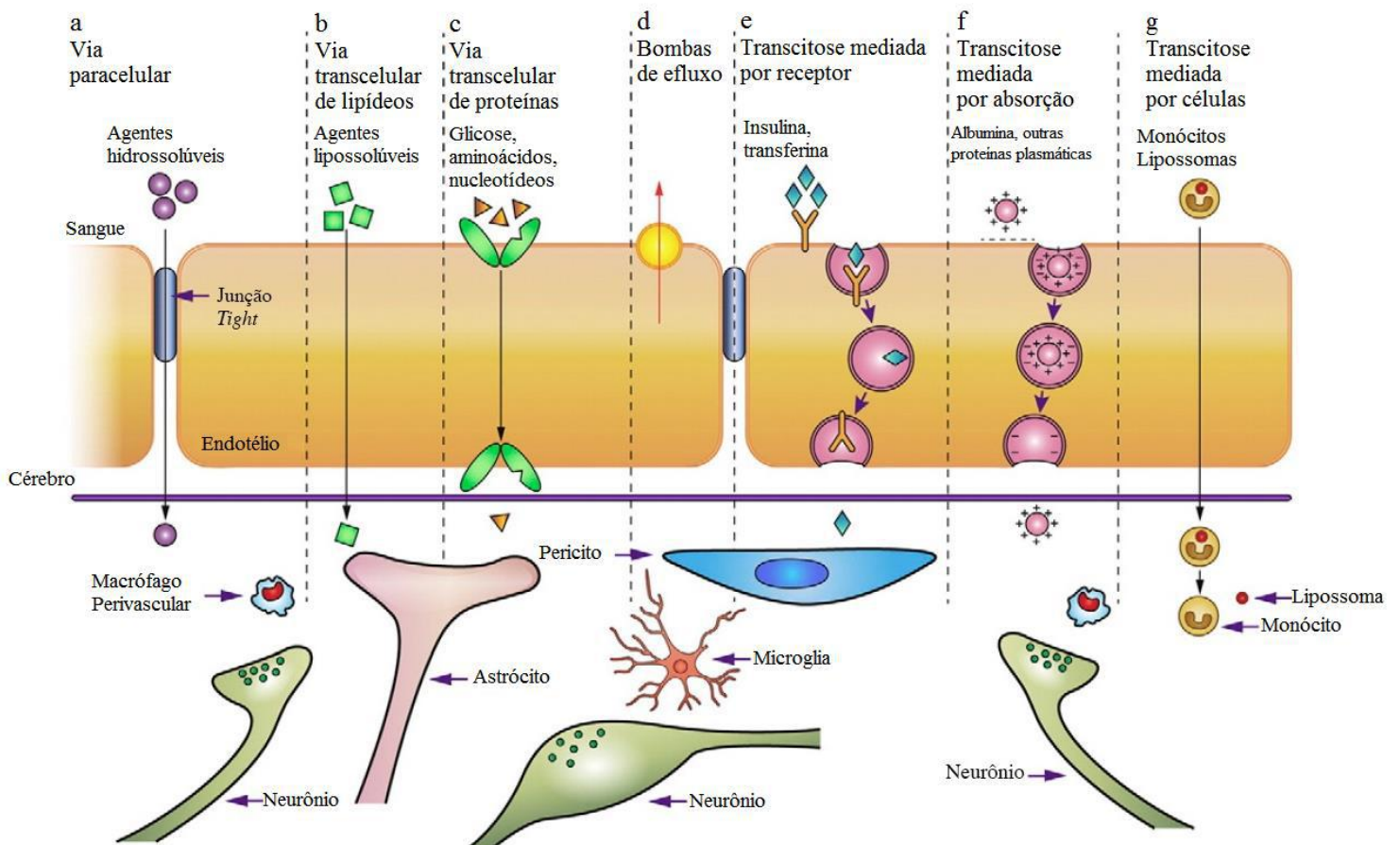


Figura III - 4. Principais mecanismos de transporte pela BHE. Rotas de “a” a “f” são usadas para moléculas e solutos, enquanto a rota “g” utiliza células imunológicas (adaptado de CHEN; LIU, 2012).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* sustentam a hipótese de que nanopartículas revestidas com surfactantes, como o polissorbatto 80, consigam atravessar a BHE. De acordo com os estudos, as nanopartículas revestidas conseguem adsorver apolipoproteínas¹⁵, naturalmente presentes no sangue, que contém receptores na BHE. Dessa forma, com a adsorção dessas proteínas, as nanopartículas poliméricas conseguem ser internalizadas pela barreira neural (KREUTER, 2001, 2014; SARAIVA *et al.*, 2016).

Alguns ligantes específicos que também podem ser utilizados são insulina, transferrina, lactoferrina ou anticorpos endoteliais, que contam com receptores específicos na superfície da BHE (CHEN; LIU, 2012; KANWAR *et al.*, 2012; KREUTER, 2014; SARAIVA *et al.*, 2016). ULBRICH *et al.* (2009) utilizaram nanopartículas de soro de albumina humana dopadas com o fármaco modelo loperamida.

¹⁵ Apolipoproteínas são proteínas responsáveis por ligações entre proteínas e lipídeos formando lipoproteínas.

Um grupo de nanopartículas foi funcionalizada por ligação covalente com transferrina e outro grupo com anticorpos monoclonais de receptores de transferrina. Após injeção intravenosa e avaliação comportamental em ratos, foi concluído que ambos os grupos foram eficazes em transportar as nanopartículas, e conseqüentemente o fármaco, através da BHE (ULBRICH *et al.*, 2009).

Outra estratégia explorada é a funcionalização de nanopartículas com peptídeo célula-penetrante (CPP). Este tipo de conformação apresenta maior potencial de passagem pela BHE do que outros sistemas de transporte, gerando alta eficiência e toxicidade celular reduzida. A eficácia é devida ao mecanismo diferenciado de transporte, tendo sido propostas duas estratégias: a penetração direta e a transcitose mediada por adsorção (CHEN; LIU, 2012; ZOU *et al.*, 2013).

O termo CPP refere-se a um grupo de peptídeos com até 30 aminoácidos de comprimento e que apresenta carga positiva, natureza anfipática¹⁶, hidrofobicidade e grande capacidade de interação com membranas lipídicas. Os primeiros CPPs derivados de proteínas naturais são o trans-ativador de transcrição (TAT) derivado do vírus HIV, e a antenapedia ou penetratina (Antp) derivado da *Drosophila melanogaster*, embora existam outros tipos de CPPs (Tabela III- 1) (CHEN; LIU, 2012; ZOU *et al.*, 2013).

Tabela III - 1. Diferentes tipos de CPPs. A sequência está relacionada ao seguinte código: K—lisina; L— leucina; A—alanina; R—arginina; Q—glutamina; I—isoleucina; W—triptofano; F— fenilalanina; N— asparagina;M—methionina; G—glicina; S—serina; T—treonina (adaptado de CHEN; LIU, 2012).

Nome do Peptídeo	Sequência de Aminoácidos	Carga Elétrica
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	+5
pAntp	RQIKIWFQNRRMKWKK	+8
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	+4
SBP	MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV	+6
FBP	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	+6
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	+8
SynB1	RGRLSYSRRRFSTSTGR	+6
SynB3	RRLSYSRRRF	+6

¹⁶ Natureza anfipática é quando uma molécula apresenta regiões hidrofílicas e hidrofóbicas.

Uma grande variedade de moléculas e ativos, como proteínas, peptídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA), lipossomas e nanopartículas, pode ser eficazmente transportada por CPPs, sendo que a conexão entre os dois grupos é geralmente feita por meio de ligação covalente. No campo do transporte através da BHE, vários CPPs já tiveram a eficiência comprovada: TAT, Angiopep, penetratina, SynB, glicoproteína do vírus da raiva (RVG) entre outros (CHEN; LIU, 2012).

RAO *et al.* (2008) compararam três grupos distintos de sistemas de entrega do fármaco antirretroviral ritonavir em ensaios *in vitro*, para estudos de transporte apical-basolateral¹⁷, e em ensaios *in vivo* em ratos, para estudos de biodistribuição do fármaco. O primeiro grupo era constituído por nanopartículas de poli(ácido láctico) (PLA) dopadas com o fármaco e conjugadas com o peptídeo TAT. O segundo grupo era constituído por nanopartículas de PLA não conjugadas. O fármaco disperso em solução foi usado como referência. O uso de nanopartículas conjugadas resultou em níveis de concentração do fármaco no cérebro 800 vezes maiores quando comparados aos resultados obtidos pela administração de fármaco em solução por duas semanas. Assim, o estudo concluiu que nanopartículas conjugadas com TAT conseguiram atravessar a BHE, apresentando características de biodistribuição diferenciadas que permitiram liberação constante sustentando níveis terapêuticos do fármaco (RAO *et al.*, 2008).

Portanto, por meio da evolução do conhecimento acerca dos mecanismos de transporte através da BHE, formulações de novos sistemas de entrega de fármacos podem ser desenvolvidos, objetivando especificamente a entrega no cérebro. Ao introduzir certas funcionalidades nas superfícies das nanopartículas, consegue-se promover mecanismos de transporte específicos através da BHE que permitem driblar as bombas de efluxo, garantindo maiores concentrações do fármaco no cérebro e com níveis sustentáveis por maior período de tempo.

¹⁷ Transporte apical-basolateral é um transporte transcelular entre as membranas apical e basolateral.

3.3. Nanopartículas Poliméricas

Conforme discutido anteriormente, as nanopartículas poliméricas apresentam grande versatilidade em termos de composição e funcionalização; por isso, são os nanocarreadores com maior potencial de uso no campo de entrega de fármacos sítio-dirigidos. Entretanto, a estrutura da nanopartícula pode afetar a estabilidade, a biodegradabilidade, a biodisponibilidade, o tempo de retenção e até a biodistribuição no organismo (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; SARAIVA *et al.*, 2016). A Figura III- 5 apresenta algumas das propriedades de nanopartículas poliméricas que influenciam a passagem pela BHE. Dessa forma, explicita-se o fato de que as nanopartículas poliméricas devam apresentar certas propriedades para que se garanta o sucesso da aplicação pretendida.



Figura III - 5. Principais características de nanopartículas que afetam o transporte pela BHE (adaptado de SARAIVA *et al.*, 2016).

Primeiramente, as nanopartículas devem ser estáveis; ou seja, não devem estar sujeitas a agregação nem dissociação na corrente sanguínea (CHEN; LIU, 2012; ELSABAHY; WOOLEY, 2013). Esta característica pode ser observada para nanopartículas com potencial zeta de ± 30 mV que mostram-se estáveis em suspensão (SINGH; LILLARD, 2009). Dessa forma, evita-se a interação com componentes dos fluidos biológicos, garantindo a homeostase do organismo (CHEN; LIU, 2012; ELSABAHY; WOOLEY, 2013). Além disso, tamanho, forma e características superficiais também afetam a eficiência e o comportamento destes nanossistemas *in vivo*.

Tendo em vista que os menores capilares sanguíneos do corpo possuem diâmetros médios entre 5 e 6 μm , sistemas particulados de tamanhos significativamente reduzidos são necessários para aplicações via venosa (SINGH; LILLARD, 2009). Não existe um consenso na literatura sobre a faixa de tamanho ideal. Nanopartículas muito pequenas parecem ser rapidamente eliminadas do organismo pelo rim, enquanto que as grandes podem induzir complicações circulatórias como a embolia¹⁸ (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; MASSERINI, 2013; SADAT; JAHAN; HADDADI, 2016). Estudos mostram que para aplicações na nanomedicina, recomenda-se que partículas devem ser menores que 200 nm (SINGH; LILLARD, 2009). Estudos mais precisos tem indicado que a faixa de tamanho mais apropriada para aplicações *in vivo* seria entre 20 e 100 nm, o que facilitaria a sua internalização e, portanto, sua eficiência (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; WANG *et al.*, 2011).

A morfologia dos nanocarreadores pode também afetar o desempenho em ensaios *in vitro* e *in vivo*. A forma mais comum de apresentação de nanopartículas é a esférica; porém, alterações de composição, pH e o uso de solventes orgânicos podem alongar a partícula, gerando estruturas cilíndricas ou vesiculares. Entretanto, o formato esférico permite melhor internalização celular do que estruturas mais alongadas (ELSABAHY; WOOLEY, 2013).

Outro aspecto de grande importância é a composição superficial da nanopartícula. A composição da superfície pode ser modulada a partir da inserção de grupos químicos, para atingir determinado objetivo específico: hidrofiliicidade, biodisponibilidade, carga de superfície, tempo de circulação, entre outros. Nanopartículas catiônicas com altos valores de potencial eletrocinético são consideradas mais tóxicas, devido ao caráter negativo das proteínas naturais, podendo induzir respostas inflamatórias e excreção (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; SARAIVA *et al.*, 2016). Assim, a fim de reduzir possíveis reatividades inespecíficas, polímeros aniônicos de tamanhos reduzidos são preferíveis como nanocarreadores de amplo espectro biológico (SADAT; JAHAN; HADDADI, 2016). Além da carga superficial, a hidrofobicidade também pode afetar as rotas metabólicas de internalização e a transcitose celular, podendo alterar rotas bioquímicas importantes de decomposição do ativo carregado (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; SARAIVA *et al.*, 2016).

¹⁸ Embolia é a obstrução de um vaso sanguíneo por um corpo estranho presente na corrente sanguínea.

A forma com que as nanopartículas transportam os ativos biológicos também pode induzir respostas toxicológicas do organismo. Os fármacos, e demais princípios ativos, podem ser adsorvidos, dissolvidos, encapsulados ou ligados covalentemente a nanopartículas. Entretanto, apenas o encapsulamento permite reduzir a resposta imunológica do organismo ao fármaco (CHEN; LIU, 2012; ELSABAHY; WOOLEY, 2013; SARAIVA *et al.*, 2016).

Nota-se, portanto, a importância de várias propriedades para que se garanta o destino e o comportamento adequado dos nanocarreadores em via sanguínea. Deve-se atentar às condições de produção, aos agentes tensoativos utilizados, à escolha do método de adsorção ou incorporação do fármaco além da seleção do polímero mais adequado.

3.3.1. *Polímeros utilizados em Sistemas de Liberação*

A escolha do polímero causa importantes impactos em propriedades de grande relevância para aplicações biomédicas e farmacêuticas como a eficiência do carregamento de fármacos e a cinética de liberação dos ativos. Adotando a premissa de que os nanocarreadores devem ser inertes em relação ao organismo humano, o polímero escolhido deve ser atóxico, biocompatível e biodegradável (CHEN; LIU, 2012; WOHLFART; GELPERINA; KREUTER, Jörg, 2012). Entretanto, de acordo com PARK (2014), para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, a característica mais importante do polímero é a biocompatibilidade, sendo o polímero biodegradável ou não (PARK, 2014).

Polímeros biodegradáveis são compostos que conseguem ser degradados pelo organismo a partir de ações enzimáticas ou de microorganismos. De acordo com a origem, os polímeros podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Dentre os polímeros de origem natural, destaca-se o uso de polímeros obtidos a partir de polissacarídeos (alginate e quitosana), aminoácidos (lisina), ácido aspártico e proteínas, como a gelatina e a albumina. Apesar destes polímeros apresentarem, naturalmente, interação com receptores específicos, o uso desses materiais pode apresentar várias desvantagens, como a variabilidade de propriedades dos lotes, a limitação para modificação química e a reduzida capacidade para rastreamento no organismo (KREUTER, 2014; SARAIVA *et al.*, 2016).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados em aplicações terapêuticas são o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), o

polietilenimina (PEI), o poli(cianoacrilato de alquila) (PACA), o poliamidoamina, o poli(cianoacrilato de butila) (PBCA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL). (SARAIVA *et al.*, 2016). Destes, o PBCA apresenta taxa de biodegradação mais rápida e o PLGA está entre os mais utilizados para liberação prolongada de fármacos (KREUTER, 2014).

Polímeros não biodegradáveis são também comumente utilizados em administrações perorais, transdérmicas ou implantes. Dentre eles, destacam-se os poliuretanos, o silicone, o poli(álcool vinílico) (PVA) e o poli(metacrilato de metila) (PMMA) (FEUSER *et al.*, 2014; SHASTRI, 2003; YAO; WEIYUAN, 2010). Para aplicações em liberação de fármacos, o transporte de ativos ocorre principalmente pela difusão de ativos através das cadeias do polímero, o que irá depender da espessura e permeabilidade da matriz polimérica (YAO; WEIYUAN, 2010). Estudos *in vivo* indicaram existência de biodegradabilidade lenta de nanopartículas de PMMA em aplicações injetáveis (intravenosas e intramusculares) em ratos e camundongos destacando a liberação controlada de ativos como área de aplicação promissora (KREUTER; TAUBER; ILL, 1979; KREUTER; LIEHL, 1981).

3.3.2. Técnicas de Preparo de Nanopartículas Poliméricas

Para o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos, algumas aplicações biomédicas como testes diagnósticos utilizam os polímeros na forma de látex (ASUA, 2002). O látex é caracterizado pela dispersão de nanopartículas poliméricas em não-solventes. Esta formulação permite a adoção de práticas mais seguras para a saúde e o ambiente, por conta da adoção de solventes menos agressivos, geralmente a água.

Apesar de existem várias técnicas para a produção de nanopartículas poliméricas (polimerização em suspensão, emulsão, com evaporação de solvente, emulsificação espontânea, difusão de solvente, nanoprecipitação, entre outros), os métodos mais aplicados para a obtenção de látices poliméricos são a polimerização em emulsão e em miniemulsão (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2015; THICKETT; GILBERT, 2007)

3.3.2.1. Polimerização em Emulsão e Miniemulsão

O termo genérico polimerização em emulsão é utilizado para descrever uma variedade de processos relacionados, como a polimerização em emulsão convencional, a polimerização em emulsão inversa, a polimerização em miniemulsão, a polimerização em

dispersão e a polimerização em microemulsão (ASUA, 2004). Este tipo de processo permite reduzir as desvantagens comparativas que outras técnicas de produção de látex apresentam, como o uso excessivo de surfactantes, a estabilidade coloidal insuficiente e a adoção de procedimentos custosos (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

Uma reação de polimerização em emulsão é um processo heterogêneo caracterizado pela dispersão de um monômero em uma fase contínua, geralmente uma solução aquosa que contém agentes surfactantes. O início da polimerização está associado a adição de um iniciador, geralmente hidrossolúvel, que promove a formação de radicais livres. Neste tipo de reação, ocorre a “compartimentalização de radicais”: os radicais são distribuídos entre as partículas e não estão sujeitos à terminação, permitindo a obtenção de altas taxas de polimerização e altas massas molares. As partículas poliméricas são formadas com a entrada de radicais nas micelas de surfactante (nucleação heterogênea), pela precipitação de oligômeros em fase aquosa (nucleação homogênea) ou, de forma menos expressiva, pela entrada de radicais em gotículas de monômeros suspensas no meio (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2004; THICKETT; GILBERT, 2007).

Após a nucleação, as partículas poliméricas crescem por meio da reação de polimerização. Entretanto, monômero não reagido deve ser transportado por difusão pela fase aquosa das gotas suspensas até as partículas de polímeros, para dar continuidade ao processo de polimerização. O processo de transferência de massa e a resistência da água causam limitações ao processo, que são parcialmente contornadas por meio da polimerização em miniemulsão. Neste caso, as gotículas de monômeros apresentam tamanhos muito reduzidos, o que permite a nucleação direta das gotas de monômero, removendo a necessidade de difusão pela fase aquosa (ASUA, 2002).

Assim, a metodologia de polimerização em miniemulsão (Figura III - 6) pode ser caracterizada como um processo heterogêneo em que é aplicada uma técnica de dispersão energética, objetivando a redução do tamanho de gotículas de monômero dispersas em uma fase contínua, geralmente aquosa e contendo agente tensoativo. Para proteção contra degradação difusional¹⁹, coagulação e coalescência das gotículas, deve ser utilizado ainda um composto insolúvel em água, denominado co-estabilizador (ASUA, 2002).

¹⁹ Degradação difusional também conhecido como “*Ostwald ripening*” é o fenômeno que descreve a difusão de moléculas de monômero de gotas menores para gotas maiores.

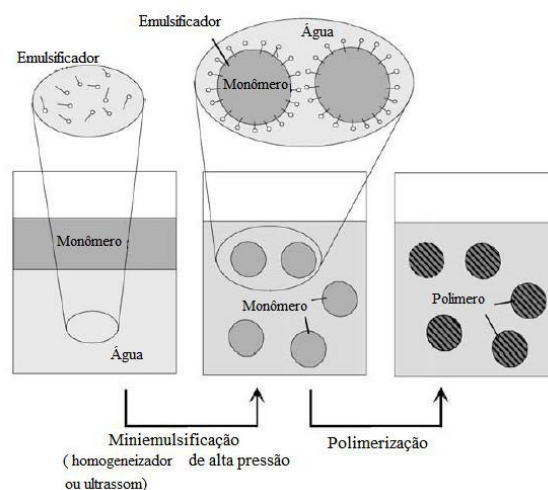


Figura III - 6. Esquema representativo da polimerização em miniemulsão (adaptado de ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

O objetivo principal da preparação da miniemulsão é iniciar a polimerização em pequenas gotículas de monômero estáveis, que funcionam como “nanorreatores”, excluindo outras formas de nucleação secundárias ou limitações associadas aos processos de transporte de massa. Sendo assim, o uso de surfactantes pode ser reduzido, a fim de evitar a formação de micelas e a nucleação micelar. Porém dependendo da concentração de tensoativos utilizada, estas estruturas podem ainda estar presentes, o que é visualmente indesejado. (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002) .

As características da polimerização em miniemulsão são dependentes da formulação, homogeneização e tempo de reação. A emulsificação pode ser realizada a partir de rotores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão ou sonicadores, sendo que o tamanho das gotículas de monômeros é influenciado pela concentração relativa de monômero e de água, da solubilidade do monômero e da concentração de tensoativos adotada. A estabilidade coloidal também é amplamente influenciada pelo tipo e concentração de surfactante. Por fim, a adição de co-estabilizante, associado a um método adequado de homogeneização, garante a condução da reação de forma estável. Dentre os co-estabilizantes mais citados em publicações, estão o hexadecano e o álcool cetílico (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002).

Nota-se que esta técnica apresenta várias vantagens operacionais como redução da quantidade de surfactante, fácil controle térmico, ausência de solventes orgânicos, alta taxa de polimerização e produção de polímeros com altas massas molares. Adicionalmente, o processo encapsulamento de ativos *in situ* é facilitado a partir da simples mistura do ativo desejado com as gotas de monômero originais. Assim, consegue-se dispersões poliméricas em escala nanométricas com maior estabilidade e segurança.

3.3.3. Encapsulamento de Rivastigmina em Nanopartículas Poliméricas

O tartarato de rivastigmina (TR) é um ativo que permite o desenvolvimento de estratégias promissoras para o tratamento da DA, pois exibe vantagens funcionais que estão ausentes em outros inibidores colinérgicos: é inibidor pseudo-irreversível de duas enzimas colinesterases, apresenta via de eliminação renal e apresenta poucas interações farmacocinéticas com outros medicamentos metabolizados hepaticamente (ANNICCHIARICO *et al.*, 2007; ONOR; AGUGLIA, 2007). Atualmente, esse fármaco é comercializado na forma de cápsulas e soluções para administração por via oral e na forma de adesivos (*patches*) para aplicação dérmica. O uso do TR está constantemente associado a efeitos gastrointestinais adversos, causando náuseas, vômitos, perda de apetite dentre outros. Além disso, o uso dérmico do TR pode causar irritações na pele (ANNICCHIARICO *et al.*, 2007; MULLER, 2007).

Com base no exposto, a literatura mostra crescente interesse pelo desenvolvimento de sistemas nanométricos capazes de carregar e entregar seletivamente o TR no local de ação. Muitas pesquisas se concentram em variáveis operacionais que permitam a obtenção de certas propriedades específicas desejadas. Dentre essas propriedades, as mais comumente encontradas na literatura são: o tamanho reduzido das partículas, diretamente ligado à segurança; a carga superficial intermediária, utilizada para garantir estabilidade da dispersão polimérica; e a alta eficiência de encapsulamento, a fim de minimizar a quantidade de material administrado. Apesar das semelhanças em relação ao objetivo final, muitas variabilidades entre os estudos podem ser encontradas, como a escolha do polímero e o método de polimerização empregado.

Nota-se uma grande tendência para investigação de polímeros naturais e biodegradáveis na formulação de nanopartículas para encapsulamento de TR. NAGPAL, SINGH e MISHRA (2013), FAZIL *et al.* (2012) e KAUR *et al.* (2011) optaram por utilizar o polímero natural quitosana como matéria prima das nanopartículas poliméricas (FAZIL *et al.*, 2012; KAUR *et al.*, 2011; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013). KAUR *et al.* (2011) estudaram a influência da variação de proporção fármaco/polímero na formulação de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de fármaco. Utilizando o método de gelatinização iônica, os autores mostraram que a eficiência de encapsulamento pode sofrer grande variação, de acordo com a proporção de fármaco/polímero adotada (43% a 84% de eficiência de encapsulamento). Entretanto a condição com melhor eficiência de encapsulamento apresentou o menor percentual de liberação do fármaco em ensaio

in vitro (67%). Apesar disso, o perfil de liberação sustentado viabiliza o uso dessas nanossistemadas para liberação controlada (KAUR *et al.*, 2011).

A influência da concentração do polímero também foi investigada por NAGPAL, SINGH e MISHRA (2013). Por meio de estudos de otimização, os autores alteraram a concentração de quitosana e *Tween* 80 para o desenvolvimento de nanopartículas de tamanhos reduzidos com altas eficiências de encapsulamento e simultânea maximização da carga de superfície. Concluiu-se que altas concentrações de monômeros e de surfactante causaram menor eficiência de encapsulamento devido a liberação do fármaco pela matriz polimérica durante a polimerização. Além disso, altas concentrações de monômero resultaram em tamanhos de partícula e carga superficiais maiores. Como era pretendido obter um equilíbrio ótimo entre diversas propriedades, a formulação final adotada apresentou baixa concentração de monômero (0,12 %m/m) e elevada carga de tensoativo (1,49 %m/m). Esta conformação garantiu a produção de nanopartículas com tamanho de 154 nm, carga líquida de 26,6 mV e com 96,36% de eficiência de encapsulamento do fármaco (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013). A baixa concentração de polímero, no entanto, certamente compromete a produção comercial do produto.

Posteriormente, a formulação otimizada de nanopartícula encoberta com *Tween* 80 foi utilizada em estudos *in vivo* com outros dois grupos de teste constituídos por TR puro e fármaco encapsulado em nanopartículas de quitosana. Ratos com amnésia induzida foram tratados por via intravenosa. Com este teste, os autores puderam comprovar que o uso de *Tween* 80 não somente aumentou a biodisponibilidade do fármaco no cérebro mas também permitiu melhorar o perfil de tolerância ao fármaco (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013).

Outros testes *in vitro* e *in vivo* realizados com nanopartículas de quitosana foram realizados por FAZIL *et al.* (2012). Procurando adotar vias de administração menos invasivas, o grupo estudou a aplicação por via nasal. Novamente, foi observado que a concentração de monômeros afeta o encapsulamento do fármaco. Como neste estudo não foi utilizado surfactante, o fato foi explicado pela existência de interação eletrostática repulsiva, que ocorre quando altas proporções fármaco/polímero são usadas, responsável por reduzir a eficiência de encapsulamento (de 85% a 75%). As nanopartículas obtidas (185 nm, 38,40 mV e 85,3% de eficiência de encapsulamento) foram utilizadas em testes *in vitro* de permeação celular em células porcinas e testes *in vivo* em ratos. Notou-se que as nanopartículas de quitosana apresentaram vantagem expressiva para permeabilização

celular (70% contra 20% de permeação, quando usado o fármaco puro) e para aplicação via nasal, já que as elas resultaram em melhor biodistribuição do fármaco no cérebro, quando comparadas com aplicação de fármaco puro por vias intravenosa ou nasal (FAZIL *et al.*, 2012).

Apesar do sucesso obtido por FAZIL *et al.* (2012) em utilizar a via nasal, NAGPAL, SINGH e MISHRA (2013) e WOHLFART, GELPERINA E KREUTER (2012) desaconselharam o uso da via de administração nasal para entrega de fármacos dirigidos ao SNC. De acordo com os autores, a biodisponibilidade do fármaco pode não ser específica em uma região do cérebro, além de não exceder níveis nanomolares, variando entre 0,01 %m/m e 0,1 %m/m. Adicionalmente, os fármacos podem ser susceptíveis a degradação pela mucosa nasal, podendo gerar irritações locais. Dessa forma, a via intravenosa seria mais adequada, segundo os autores (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013; WOHLFART; GELPERINA; KREUTER, 2012).

Além da quitosana, alguns polímeros sintéticos biodegradáveis estão sendo estudados para o desenvolvimento de sistemas de liberação de TR. PAGAR E VAVIA (2013) estudaram a síntese de nanopartículas de poli(l-lactídeo-depsipeptídeo) por emulsão com evaporação de solvente, a partir de variações das condições operacionais. Dentre os principais achados, tamanhos reduzidos foram obtidos por meio da combinação de baixa carga de polímeros e alto tempo de sonicação, formando gotículas de emulsão menores e mais estáveis. Entretanto, para aumentar a eficiência de encapsulamento do fármaco, foi recomendado o uso de alta proporção fármaco/polímero e baixa proporção fase orgânica/fase aquosa. As melhores nanopartículas obtidas (142 nm com 61% de encapsulamento) foram submetidas a testes de liberação *in vitro* em células de diálise, que confirmaram a liberação controlada de 90% do fármaco encapsulado em 72h (PAGAR; VAVIA, 2013). Uma vez mais, as baixas concentrações de polímeros e as relativamente baixas eficiências de encapsulamento podem comprometer a produção comercial.

Outro polímero sintético explorado foi o poli(óxido de etileno), formador de nanopartículas por meio do método de deslocamento de solvente. VIJAYKUMAR, JOE E VISHWANATH (2014) utilizaram diferentes condições experimentais, objetivando obter altas taxas de encapsulamento do fármaco. Foi observado que a proporção fase orgânica/fase aquosa e fármaco/polímero afetaram a eficiência do encapsulamento do fármaco. A condição com maiores proporções fármaco/polímero e menores proporções fase orgânica/fase aquosa geraram maior eficiência de encapsulamento (86,53%). Neste

caso, foram usadas maiores concentrações de polímero, garantindo melhor interação fármaco-solvente e maior viscosidade e taxa de encapsulamento (VIJAYKUMAR; JOE; VISHWANATH, 2014).

O polímero biodegradável PBCA também apresenta grande aplicabilidade no ramo biomédico. WILSON *et al.* (2008) e JOSHI *et al.* (2010) utilizaram a técnica de polimerização em emulsão para síntese de nanopartículas de PBCA para encapsulamento de tartarato de rivastigmina. Entretanto, os estudos usaram abordagens diferenciadas. WILSON *et al.* (2008) procurou estudar o efeito do uso de revestimento de polissorbato 80 em nanopartículas PBCA. Novamente, foi observada que a eficiência de encapsulamento era dependente da proporção fármaco/polímero: quanto maior era a carga de polímero utilizada, menos fármaco era incorporado na matriz. Além disso, após o revestimento pelo surfactante, a eficiência de encapsulamento foi reduzida ainda mais de 18% para 15%, como também descrito por NAGPAL, SINGH e MISHRA (2013) para partículas de quitosana, fato que compromete a produção comercial do nanossistema. Apesar da baixa eficiência de encapsulamento, foram realizados testes *in vivo* com ratos, sendo possível observar que as nanopartículas revestidas aumentaram em aproximadamente quatro vezes a quantidade de fármaco no cérebro (WILSON *et al.*, 2008).

JOSHI *et al.* (2010) utilizaram planejamento fatorial para avaliar o efeito de variáveis experimentais na síntese de nanopartículas de PBCA e de PLGA, utilizando a técnica de nanoprecipitação. Para as duas análises foram obtidas partículas menores que 200 nm e observada a influência da concentração de polímero no encapsulamento. Para o PLGA foram encapsulados 75% do fármaco, enquanto que para o PBCA, apenas 57,32% foram encapsulados, explicado pela baixa solubilidade do fármaco no polímero. Ambas as partículas foram utilizadas em testes *in vivo*, mostrando melhoras significativamente mais rápida, quando comparadas com as obtidas por meio da administração da solução do fármaco. Devido a diferenças estruturais e peso molecular, o percentual de liberação *in vitro* foi diferenciado: 43,6% do fármaco foi liberado por PBCA, enquanto 30,9% foi liberado por PLGA (JOSHI; CHAVHAN; SAWANT, 2010).

Analisando os estudos mencionados, nota-se a grande influência da solubilidade do fármaco no polímero no percentual final de encapsulamento. Sabendo-se que o TR possui características hidrofílicas, utilizá-lo em situação que requeira solubilização em composto orgânico pode constituir uma difícil missão. Felizmente, a formulação de

rivastigmina base livre (RBL), ilustrada na Figura III - 7, que é mais lipossolúvel e pode ser obtida a partir do sal por meio de reação de dupla troca com hidróxido de sódio, está disponível comercialmente.

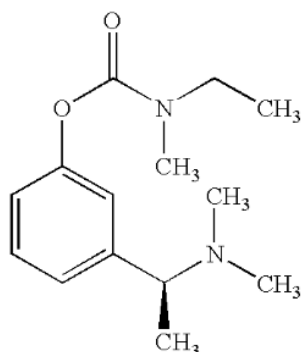


Figura III - 7. Fórmula estrutural da rivastigmina base livre.

CRAPARO *et al.* (2008) estudaram a síntese de nanopartículas de poli(metacrilato de hidroxietilaspirtamida) (PHM) e de reticulado com poli(etileno glicol) (PEG₂₀₀₀) para encapsulamento e liberação de TR e RBL. As nanopartículas foram sintetizadas por irradiação UV em microemulsão inversa e foram utilizadas duas técnicas de encapsulamento. Para a RBL, foi utilizada a técnica de imersão; porém, para o TR foram comparados dois cenários diferentes: usando imersão ou encapsulamento durante o processo de irradiação UV. A partir da análise de carga superficial e de testes de liberação *in vitro*, foi concluído que as moléculas do fármaco tendem a adsorver na superfície das partículas, não sendo encapsuladas. A técnica de encapsulamento durante o processo de irradiação UV, alterou o tamanho inicial da partícula, que passou de 200 nm, ao contrário do observado para os outros casos (aproximadamente 120 nm). Para TR irradiado, foram liberados 32% em tampão fosfato pH 7,4 e 23% em plasma sanguíneo humano, em 24 horas. Já para as técnicas de imersão, foram liberados 90,8% e 75,2% de TR; e 79,8% e 67,5% de RBL, em tampão e plasma, respectivamente. Neste último, observou-se um esperado comportamento de liberação mais lento, devido a menor solubilidade nos meios utilizados (CRAPARO *et al.*, 2008).

Um importante achado sinalizado por todos os autores que realizaram testes de liberação *in vitro* foi a ocorrência de um perfil de liberação do fármaco em duas etapas, encontrado independentemente do material que constituía a nanopartícula (FAZIL *et al.*, 2012; JOSHI; CHAVHAN; SAWANT, 2010; KAUR *et al.*, 2011; NAGPAL; SINGH, MISHRA, 2013; PAGAR; VAVIA, 2013; VIJAYKUMAR; JOE; VISHWANATH, 2014; WILSON *et al.*, 2008). Isto sugere que inicialmente moléculas de fármaco adsorvidas ou

encontradas em camadas mais externas sejam liberadas mais rapidamente. Posteriormente, observa-se uma segunda etapa, quando ocorre difusão do fármaco pela matriz polimérica, resultando na liberação mais lenta e controlada de fármaco. Dessa forma, por conta deste perfil em duas etapas, garante-se que partículas poliméricas possam ser utilizadas para liberação controlada desses fármacos.

A Tabela III - 2 abaixo apresenta os principais resultados aqui discutidos.

Tabela III - 2. Resumo dos principais achados na literatura para encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas poliméricas.

Polímero	Fármaco	Eficiência de Encapsulamento (%)*	Percentual Liberado (%)*	Tamanho de Partícula (nm)*	Referência
PHM	TR	9 – 12	32 e 90 (24h)	160 - 245	CRAPARO <i>et al.</i> (2008)
	RBL		70 (24h)		
PBCA	TR	18	85 (24h)	40	WILSON <i>et al.</i> (2008)
PLGA	TR	75	30 (72h)	135	JOSHI <i>et al.</i> (2010)
PBCA		60	40 (72h)	145	
Quitosana	TR	80	70 (12h)	260	KAUR <i>et al.</i> (2011)
Quitosana	TR	85	90 (24h)	185	FAZIL <i>et al.</i> (2012)
Quitosana	TR	95	80 (24h)	155	NAGPAL, SINGH E MISHRA (2013)
Poli(1-lactíde-depsipeptídeo)	TR	60	90 (72h)	140	PAGAR E VAVIA (2013)
Óxido de Polietileno	TR	85	76 (12h)	100	VIJAYKUMAR, JOE E VISHWANATH (2014)

*Valores aproximados

Baseado no amplo espectro de polímeros e técnicas de polimerização abordados, nota-se a promissora aplicação do uso de polímeros para produção de nanocarreadores de rivastigmina. Excetuando-se apenas as nanopartículas de PBCA produzidas por WILSON *et al.* (2008), com 40 nm, cabe ressaltar que os demais nanossistemas poliméricos discutidos apresentaram tamanhos superiores aos sugeridos por ELSABHY E WOOLEY (2013) para finalidade biomédica (ELSABAHY; WOOLEY, 2013). Dessa forma, ainda são necessários aprimoramentos de algumas das propriedades dos nanossistemas poliméricos estudados.

Tendo em vista as propriedades específicas do fármaco, como a solubilidade no polímero, pode-se escolher uma matriz polimérica e o método de polimerização mais adequados para a finalidade de interesse. Nota-se ainda a interferência de múltiplas variáveis experimentais na qualidade final do produto, ressaltando-se a importância de testes preliminares para formulação de protocolos experimentais mais pertinentes.

3.4. Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas

De acordo com as Recomendações da IUPAC (2004), a funcionalização polimérica pode ser definida como:

“Introdução de grupos químicos desejados em moléculas poliméricas, a fim de criar propriedades químicas, físicas, biológicas, farmacológicas ou outras específicas.”

(PAC, 2004, v.76, p.894)

Dessa forma, por meio de técnicas de funcionalização das nanopartículas poliméricas, pode-se introduzir certas características, antes ausentes ou pouco presentes, com o objetivo de melhorar o desempenho obtido. No caso de aplicações biomédicas, a funcionalização pode garantir a não citotoxicidade, melhorar a capacidade de internalização celular, aperfeiçoar o reconhecimento seletivo e criar proteção contra o sistema imunológico do organismo (MOUT *et al.*, 2012). Dependendo do objetivo almejado, podem ser utilizados diferentes tipos de ligantes, incluindo desde pequenos peptídeos e aminoácidos, até anticorpos e surfactantes, como ilustrado na Figura III - 8.

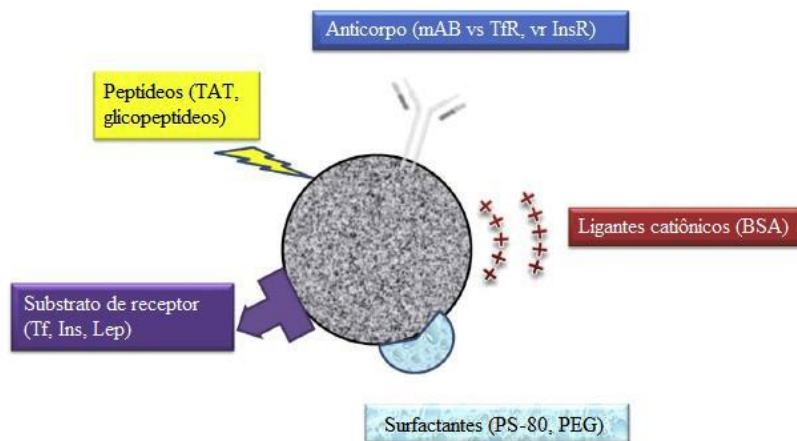


Figura III - 8. Representação esquemática de alguns ligantes utilizados para funcionalização de partículas voltadas à entrega sítio específica no SNC (adaptado de Tosi *et al.*, 2016). Sendo mAB: anticorpo de receptor de insulina, TfR: receptor de transferrina, InsR: receptor de insulina, TAT: peptídeo trans-ativador de transcrição, Tf: transferrina, Ins: insulina, Lep: leptina, PS-80: polissorbato 80, PEG: polietileno glicol e BSA: albumina de soro bovino

A síntese de partículas funcionalizadas pode ser realizada durante a polimerização, por meio da incorporação de comonômeros funcionais, ou a partir de modificações químicas em polímeros pré-formados, baseando-se em características físico-químicas específicas do produto. Assim, é possível imobilizar uma biomolécula em partículas poliméricas por meio de adsorção física ou ligações covalentes. No primeiro caso, são realizadas interações do tipo hidrofóbicas, pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas, enquanto no segundo ocorre a formação de uma ligação química do tipo covalente entre a partícula e a biomolécula por meio de grupos químicos naturalmente presentes na biomolécula, como amina, hidroxila e carboxila (PICHOT, 2004). A Figura III - 9 abaixo resume os principais mecanismos utilizados para imobilizações de biomoléculas em substratos poliméricos (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

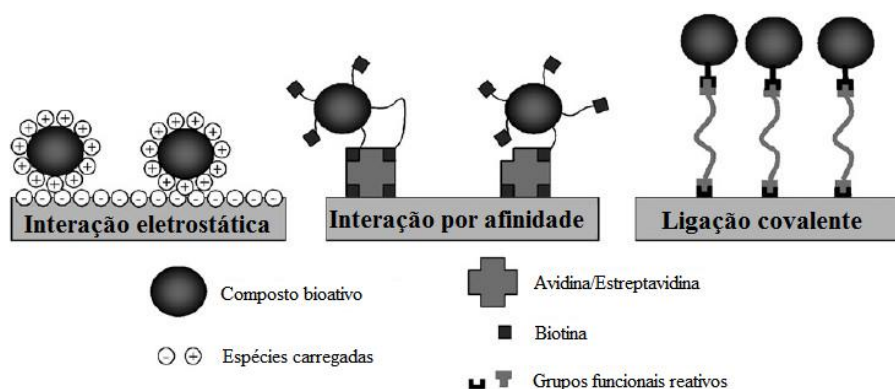


Figura III - 9. Mecanismos mais comuns para imobilização de compostos em superfícies poliméricas (adaptado de Goddard e Hotchkiss, 2007).

3.4.1. Adsorção não Específica

O método de bioconjugação por meio de adsorção não específica é a técnica mais facilmente empregada para modificação superficial de suportes. A técnica é baseada em interações hidrofóbicas e eletrostáticas existentes entre a biomolécula e a superfície (RODDA *et al.*, 2014; WELSCH *et al.*, 2013). Entretanto, a técnica de adsorção apresenta algumas desvantagens. Uma delas é o fato de que a interação com a superfície pode alterar a conformação da biomolécula, afetando a sua funcionalidade. Segundo RODDA *et al.* (2014), a orientação da molécula não pode ser controlada nesse processo, inviabilizando o uso de alguns sítios ativos. Além disso, a adsorção pode não ser seletiva e fraca. Assim, além da fácil dessorção da molécula de interesse, outras proteínas e contaminantes podem ser adsorvidos, gerando uma adsorção competitiva de compostos indesejáveis, reduzindo a eficiência do processo (RODDA *et al.*, 2014).

3.4.2. Adsorção por Ligação Covalente

Por outro lado, a funcionalização a partir de ligação covalente permite criar interações mais estáveis e específicas entre uma biomolécula e um suporte. Assim, é preferível utilizar bioconjugação por ligação covalente para algumas aplicações. Na área biomédica, por exemplo, a imobilização covalente pode apresentar vantagens, como aumento de meia-vida do medicamento e prevenção de biodegradação do composto (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

Quando se deseja realizar a bioconjugação de moléculas específicas a uma superfície inerte, como a de uma nanopartícula, é necessário um grupo funcional adequado e particular para este fim. Por isso, técnicas de modificação superficial podem ser aplicadas com o objetivo de inserir funcionalidades; ou seja, um precursor de ligação específico para um composto bioativo.

A técnica *wet chemical*, por exemplo, possibilita a inserção de aminas primárias em PMMA, PLA e PLGA por aminólise, utilizando como precursores vários tipos de diaminas e diaminas litiadas. O método de monocamada de silano permite a adesão de polímeros orgânicos a substratos inorgânicos, utilizado para síntese de sistemas microeletrônicos. Adicionalmente, o tratamento com gases ionizados, como o O₂, pode ser utilizado para a introdução de grupos oxigenados sem utilizar solventes orgânicos e produzir rejeitos tóxicos. Por fim, o processo de irradiação de luz UV permite gerar locais reativos e grupos funcionais, como no caso da inserção de grupos carboxílicos em PMMA (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

Entretanto todos estes métodos apresentam muitas limitações. Caso não seja possível gerar grupos funcionais suficientes na superfície ou se o biocomposto for muito sensível, a ponto de perder a atividade biológica quando imobilizado, é necessária a utilização de intermediários. Uma das estratégias adotadas é o uso de reagentes funcionais, como o ácido acrílico, que pode ser utilizado para adicionar terminais carboxílicos no suporte. Assim, aumenta-se o número de locais reativos disponíveis na superfície para realização de imobilização dos biocompostos (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

Para a realização da etapa de imobilização de biomoléculas, é necessária a compatibilidade entre a funcionalidade da superfície e a do biocomposto. Para isso, são utilizados agentes de reticulação capazes de conectar a biomolécula ao grupo funcional do suporte. Existem diferentes tipos de agentes que podem ser usados para esse fim e a escolha do mais adequado depende de condições de bioconjugação, como pH, temperatura, solubilidade e, logicamente, da molécula utilizada (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). Dentre os agentes de reticulação mais utilizados entre terminais carboxílicos e aminas primárias, destaca-se a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

De acordo com HERMANSON, MALLIA e SMITH (1992), a EDC permite a formação de uma ligação peptídica entre o nitrogênio da biomolécula e o grupo carboxílico da superfície polimérica. A reação ocorre em duas etapas (Figura III - 10): primeiro ocorre a ativação dos grupos carboxílicos e formação de um composto instável, altamente reativo, entre o suporte e a EDC (preferencialmente em pH's 3,5-4,5); em seguida ocorre a reação com a amina da biomolécula (pH 4-6). Este agente reticulante possui a vantagem de produzir subprodutos hidrossolúveis e não requerer o uso de solventes orgânicos (HERMANSON; MALLIA; SMITH, 1992).

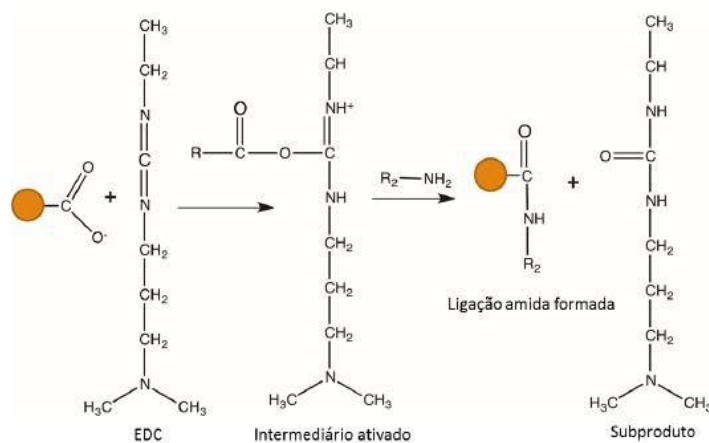


Figura III - 10. Formação de bioconjugação com o agente de reticulação EDC (Campos-Ramos, 2016).

De acordo com o que foi discutido na Seção 3.2.2., uma das alternativas para direcionamento específico de nanopartículas ao SNC é o uso de CPP's como o TAT. LIU *et al.* (2008) utilizaram a EDC juntamente com N- hidroxisuccinimida (NHS) como estratégia de bioconjugação do peptídeo TAT a nanopartículas de PEG-colesterol. A comprovação da ligação foi realizada a partir do uso de técnicas espectrais, como a ressonância magnética nuclear (RMN), e testes *in vivo*, que confirmaram maior captação de nanopartículas com o peptídeo TAT (LIU *et al.*, 2008).

MALHOTRA, TOMARO-DUCHESNEAU e PRAKASH (2013) também utilizaram a EDC para conjugação de nanopartículas PEQ-quitosana com TAT para entrega de RNA a células do SNC. Os autores utilizaram com 4- (dimetilamino) piridina (DMAP) e EDC para promover a ligação peptídica. A confirmação da ligação se deu pela leitura de espectros de RMN e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) que explicitaram a formação de ligação amida, antes ausente no polímero (MALHOTRA; TOMARO-DUCHESNEAU; PRAKASH, 2013).

Assim, nota-se que o uso de EDC pode ser associado a agentes co-estabilizantes, como NHS e DMAP, com o objetivo de auxiliar a formação da ligação amida. Além disso, percebe-se que a conjugação pode ser facilmente visualizada por métodos espectrométricos, facilitando a confirmação e caracterização do produto. Logo, pode-se concluir que o uso de agentes funcionalizados apresenta-se como uma técnica promissora e de ampla aplicabilidade para o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos sítio-dirigidos.

3.5. Liberação de Fármacos e Modelos Cinéticos

O termo “liberação de fármaco” é referente ao processo de transporte por meio do qual o fármaco migra de uma condição inicial em um sistema polimérico para a superfície exterior da partícula e, por fim, para o meio de externo. Vários fatores influenciam esse processo, como as propriedades físico-químicas do fármaco, a estrutura da matriz polimérica, o meio de liberação e a interação entre esses fatores (YAO; WEIYUAN, 2010).

Para o caso de encapsulamento de fármacos em sistemas poliméricos, a difusão de soluto no meio particulado, o inchamento com solventes, a erosão e a degradação da matriz polimérica são as principais forças motrizes de liberação do fármaco. As Leis de Fick podem ser utilizadas para descrever o deslocamento difusivo do soluto na matriz polimérica, quando o tempo de relaxação do polímero é muito maior que a difusão do solvente. Caso contrário, trata-se de um comportamento não-Fickiano, requerendo modelagens cinéticas empíricas (YAO; WEIYUAN, 2010).

A cinética de liberação do tipo ordem zero é a distribuição mais desejável, pois apresenta uma liberação constante, minimizando oscilações de concentração do fármaco e a necessidade de re-administração. Este perfil pode ser atingido em situação na qual o fármaco esteja envolto por uma membrana permeável tanto por água quanto pelo ativo. Dessa forma, após hidratação do núcleo da cápsula, o fármaco se dissolve até atingir a concentração de saturação. Entretanto, geralmente o perfil observado é o de rápida absorção e eliminação do fármaco, como observado na Figura III - 11 (FALLIS, 2013).

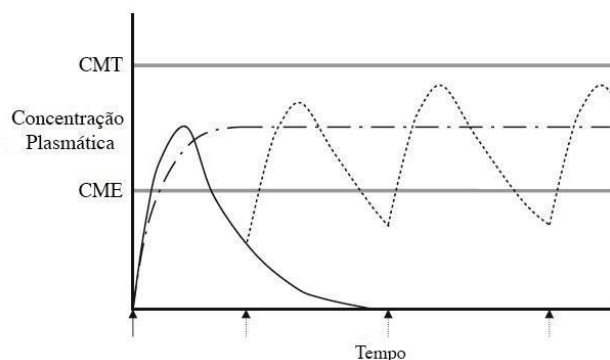


Figura III - 11. Comparação da concentração de fármaco na circulação sanguínea de fármacos rapidamente adsorvidos e eliminados (curva pontilhada) e de cinética de ordem zero de liberação (curva ponto-traço). Deseja-se manter a concentração do ativo na “janela terapêutica”; ou seja, abaixo da concentração mínima de toxicidade (CMT) e acima da mínima efetiva (CME) (adaptado de FALLIS, 2013).

O modelo de Higuchi descreve a liberação de fármacos a partir de uma matriz não degradável onde o fármaco se encontra disperso. Supõe-se difusão em estado estacionário ou pseudoestacionário, quando se pode aplicar a Lei de Fick. Já o modelo de Peppas introduz o conceito semiempírico da Lei da Potência. Esta última é uma equação geral descritiva que, de acordo com o valor do parâmetro “n” pode representar vários tipos de mecanismos diferentes: Fickianos ($n=0,5$), não Fickianos ($0,5 < n < 1$) e de ordem zero ($n = 1$) (LAO *et al.*, 2011). A Tabela III - 3 abaixo apresenta os principais modelos cinéticos empíricos utilizados para descrever cinética de liberação de fármacos em matrizes poliméricas.

Tabela III - 3. Principais modelos matemáticos empíricos descritivos da cinética de liberação, em que k é a constante cinética do modelo, Q é a fração de fármaco liberada no tempo t e Q_0 é a quantidade inicial do fármaco.

Modelo	Equação
Ordem Zero	$Q = k_0 \cdot t + Q_0$
Primeira Ordem	$Q = Q_0 \cdot e^{k_1 \cdot t} - Q_0$
Higuchi	$Q = k_H \cdot \sqrt{t}$
Peppas	$Q = k_p \cdot t^n$

Com base em modelos matemáticos empíricos ou teóricos, a liberação de fármacos pode ser avaliada por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Estudos *in vivo* são categorizados como experimentos em ambientes naturais como tecidos ou organismos vivos. Já testes *in vitro* são aqueles realizados em condições controladas, geralmente em placas de Petri ou tubos de ensaio. Para testes *in vivo*, ratos são comumente utilizados como modelo de estudo principalmente as espécies *Sprague-Dawley* e *Wistar*. Os testes *in vivo* certamente são mais apropriados para avaliar interações e o desempenho de liberação em organismos vivos, entretanto, devido a complexidade experimental dos estudos (preparo experimental, empecilhos legais, condições específicas, custos adicionais...), ensaios *in vitro* vem apresentando importância crescente. Para avaliação de liberação de fármacos, estes utilizam tampões fisiológicos e temperatura de 37 °C, e permitem tirar conclusões acerca da estrutura e comportamento molecular do sistema polimérico, da existência de possíveis interações fármaco-polímero, de efeitos e mecanismos envolvidos na liberação e de dados do modelo de liberação (D’SOUZA; DELUCA, 2006).

Apesar do grande desenvolvimento de pesquisas na área, a Farmacopeia dos Estados Unidos da América não apresenta um protocolo regulamentado para a condução de testes de liberação *in vitro* de produtos administrados subcutaneamente ou intramuscularmente. Dessa forma, ainda há muitas metodologias em desenvolvimento.

Certas considerações devem ser sempre feitas antes da realização de um teste de liberação *in vitro*. O meio de liberação é de grande importância e deve ser escolhido conforme a solubilidade e estabilidade do fármaco. Outro ponto relevante é a adoção de *condições sink*²⁰. No caso de testes que utilizem pequeno volume de meio, deve-se substituir integralmente o meio para assegurar a solubilidade do fármaco e evitar o acúmulo de produtos de degradação de polímero (D'SOUZA; DELUCA, 2006). Caso contrário, deve-se assegurar volume de meio suficiente para garantir que se ultrapasse do limite de saturação do fármaco.

Adicionalmente, deve-se manter as *condições burst*²¹. O método aplicado deve fornecer informações sobre o início da liberação do fármaco, já que isto pode trazer informações acerca da eficácia e segurança do processo *in vivo*. Por fim, outra consideração importante é a robustez da técnica. A metodologia aplicada deve ser capaz de avaliar a influência da formulação e atuar como um controle de qualidade.

Os métodos mais comumente utilizados para cinética de liberação de fármacos de sistemas poliméricos particulados são métodos de separação, de fluxo contínuo e diálise. Dentre estes, os métodos de separação são os mais utilizados. Neles, a amostra com fármaco encapsulado é inserida em um frasco contendo o meio de liberação. Em intervalos de tempo selecionados, alíquotas do sistema são retiradas e as partículas são centrifugadas com auxílio de membranas. Por meio da análise do sobrenadante, observa-se a liberação do fármaco no decorrer do tempo (D'SOUZA; DELUCA, 2006). NAGPAL, SINGH e MISHRA (2013), e BAYSAL *et al.* (2016) são alguns autores que utilizaram testes *in vitro* em tampão fosfato para avaliar a liberação de fármacos de nanopartículas poliméricas (BAYSAL *et al.*, 2016; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2013).

Para métodos de fluxo contínuo, o meio é circulado através de uma coluna que contém as partículas e a liberação do fármaco é avaliada com o decorrer do tempo. Já para o método da diálise, é utilizada uma membrana de diálise a qual realiza a separação das

²⁰ Condição sink é a condição onde o volume do meio de dissolução é no mínimo três vezes maior que aquele necessário para saturação do fármaco.

²¹ Condição burst é definida como a condição que permite liberação inicial rápida.

partículas e do meio, para onde o fármaco é liberado. Todos os métodos apresentam alguma limitação, como variação do fluxo de escoamento, agregação de partículas e tempos demasiadamente longos para atingir estado estacionário (D'SOUZA; DELUCA, 2006).

Apesar das limitações, os testes *in vitro* ainda constituem ótimas alternativas para avaliar o comportamento de liberação de fármacos. Ao objetivar a mimetização do desempenho *in vivo*, estes testes apresentam grande potencial para uso como medidas de controle de qualidade.

3.6. Estudos in vitro para Avaliação de Biocompatibilidade

A elevada especificidade da superfície de nanomateriais pode promover intensa reatividade química e física, induzindo respostas diferenciadas em ambientes biológicos. Considerando a aplicação da nanotecnologia para fins farmacêuticos, ressalta-se a importância da caracterização do comportamento do produto considerado em situação de exposição intencional ou inadvertida. Dessa forma, são necessários o desenvolvimento e a validação de protocolos experimentais *in vitro*, como estratégia preliminar de avaliação do comportamento físico-químico, toxicológico e outros efeitos destes nanomateriais em um organismo vivo (BAHADAR *et al.*, 2016; JONES; GRAINGER, 2009).

Para análise de compatibilidade ou toxicidade de um nanomaterial devem ser investigados efeitos e interações com proteínas e células incluindo perturbações membranares, alterações em cascatas de sinalização, transportes intracelulares, regulações genéticas, efeitos apoptóticos²² dentre outros. Para este fim, são comumente utilizados ensaios que empregam cultivos celulares de linhagens comerciais ou primárias, com o objetivo de mimetizar uma resposta a um fenômeno obtido *in vivo*. As linhagens celulares mais utilizadas são as células fagocíticas, para a simulação de resposta do sistema imunológico; as células hepáticas e glóbulos vermelhos para medição de toxicidade em corrente sanguínea; as células epiteliais e endoteliais, para o estudo de transporte de nanomateriais por barreiras fisiológicas altamente seletivas; e as células cancerígenas como modelos de aplicação terapêutica sítio-dirigida (JONES; GRAINGER, 2009).

²² Efeitos apoptóticos são efeitos provenientes da morte celular programada (apoptose).

Dentre as diferentes estratégias utilizadas para avaliação da citotoxicidade, os testes de viabilidade celular estão entre os mais utilizados, devido a sua alta precisão e rapidez (KROLL *et al.*, 2009). Estes métodos são baseados no uso de indicadores de atividade metabólica, como forma de determinação do número de células viáveis remanescentes após um período de incubação definido. Dentre as metodologias usadas para quantificação de células metabolicamente ativas, a detecção da molécula energética adenosina trifosfato (ATP) por um marcador luminescente é considerada como ensaio padrão ouro de alto rendimento, devido à sua alta sensibilidade, confiabilidade e conveniência (KROLL *et al.*, 2009; RISS; MORAVEC; NILES, 2011).

Apesar dos protocolos padrões para ensaios *in vitro* estarem descritos em ensaios de biocompatibilidades na norma ISO 10993, ainda não existe uma metodologia definitiva para condução de ensaios *in vitro* com nanopartículas, devido à alta variabilidade das linhagens celulares e dos nanomateriais presentes. Dessa forma, constitui um desafio de extrema importância a confirmação de resultados e métodos usados para a determinação de informações e conclusões com credibilidade (JONES; GRAINGER, 2009; KROLL *et al.*, 2009).

3.7. Comentários Finais

Foram levantados pontos relevantes para o desenvolvimento de sistemas visando à liberação controlada de fármacos e voltados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial a doença de Alzhiemer. Existe uma crescente preocupação com o tratamento desta doença, tendo em vista o aumento do número de portadores e o uso de tratamentos sintomáticos que apresentam vários efeitos adversos associados.

A busca por estratégias de tratamento mais eficazes e seguras tem impulsionado o uso da nanotecnologia para síntese de carreadores que atravessem a barreira hematoencefálica. Mostrou-se que nanopartículas poliméricas apresentam grande versatilidade e, por isso, alto potencial para o uso nesta área. Além disso, foi mostrado que a funcionalização com anticorpos específicos ou peptídeos de internalização celular é capaz de promover a passagem do nanocarreador pela BHE, melhorando a disponibilização de fármacos no cérebro.

Por isso, existem estudos na literatura objetivando o encapsulamento de tartarato de rivastigmina, um dos fármacos mais utilizados no tratamento de Alzheimer, em nanopartículas poliméricas. Entretanto, algumas limitações ainda são observadas, como elevados tamanhos de partícula e baixos percentuais de liberação e encapsulamento. Assim, este trabalho procura desenvolver um nanocarreador polimérico mais eficiente e mais seguro, utilizando conhecimentos das áreas de polimerização e de fenômenos interfaciais para síntese de nanopartícula funcionalizada capaz de carrear a rivastigmina base livre através da barreira hematoencefálica.

Capítulo IV

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para as reações de polimerização em miniemulsão, foram utilizados os seguintes reagentes:

- monômero metacrilato de metila (MMA) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,5%;
- monômero ácido acrílico (AA) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), com pureza mínima de 99%;
- surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com 99% de pureza mínima;
- iniciador persulfato de potássio (KPS) fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com 99% de pureza mínima;
- agente tamponante bicarbonato de sódio PA fornecido pela PROQUIMIOS (Rio de Janeiro, Brasil), com 99,7% de pureza mínima;
- agente co-estabilizante n-hexano PA fornecido pela Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil), com 99,5% de pureza mínima;
- agente paralizante de reação hidroquinona fornecido pela Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- fármaco rivastigmina base livre da fornecido pela Carbosynth (Berkshire, Inglaterra) com 98% de pureza;
- reagente tetrahidrofurano (THF) fornecido pela Tedia Inc (Rio de Janeiro, Brasil), grau HPLC/Spectro para caracterização de massas molares;
- água destilada.

Para os ensaios de funcionalização de nanopartícula foram utilizados:

- aminoácido lisina fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), com pureza mínima de 98%;
- proteína TAT HIV-1 (TAT) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil), com 98% de pureza mínima;
- proteína albumina de soro bovino (BSA) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro), com 98% de pureza mínima;
- reagente de ativação 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) carbodiimida (EDC) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 97% de pureza mínima;
- reagente *Bradford* fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- reagente orto-ftaldialdeído (OPA), solução completa na concentração de 1 mg/mL, fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- marcador de fluorescência 2-aminobenzamida (ABZ) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 98% de pureza mínima;
- solução tampão fosfato pH 6,8 preparada em laboratório utilizando fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico, ambos fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 99% de pureza mínima;
- solução tampão tetraborato de sódio pH 9,7 preparada em laboratório utilizando tetraborato de sódio e hidróxido de sódio, ambos fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 97% de pureza mínima.

Para o ensaios de liberação *in vitro*:

- surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com 99% de pureza mínima;
- solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 preparada em laboratório utilizando cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico hidratado, todos fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com 99% de pureza.
- fase móvel utilizada na quantificação por HPLC: acetonitrila PA e ácido fosfórico PA ambos fornecidos pela Tedia (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%, e água MilliQ;

Para os ensaios *in vitro* de citotoxicidade e permeabilidade celular foram usados:

- linhagem celular Caco-2 derivadas de um adenocarcinoma do cólon humano (ATCC HTB-37™);
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) fornecido pela GIBCO (Massachusetts, Estados Unidos da América) suplementado com 4,5 g/L de glicose, 10% m/m de soro fetal bovino (SFB), 2% m/m l-glutamina e 10 mL/L de solução antibiótica comercial, contendo penicilina (10000 U) e estreptomicina (10 mg/mL), todos fornecidos pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- reagente tripsina fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) padrão referência.
- solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) fornecido pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 98,5%;
- kit para ensaio de viabilidade celular *CellTiter-Blue*® fornecido pela Promega (Rio de Janeiro, Brasil);
- placas acrílicas de fundo branco com 96 poços estéreis fornecidas pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- membranas de poliéster para cultura celular *Corning*® *Transwell*® fornecidas pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- garrafas de cultura estéreis TPP® de 75 cm² fornecidas pela Sigma Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil);
- água destilada estéril.

A não ser que seja feita referência explícita contrária, todos os materiais foram usados como recebido e sem qualquer tipo de purificação adicional.

4.2. Métodos

4.2.1. Reação de Polimerização em Miniemulsão

Neste trabalho foi adotada a metodologia de polimerização em miniemulsão com o objetivo de sintetizar nanopartículas de tamanhos reduzidos e menores que 100 nm. Conforme descrito por ELSABAHY e WOOLEY (2013) esta faixa de tamanhos seria mais segura para aplicações biomédicas *in vivo* (ELSABAHY; WOOLEY, 2013).

A metodologia de polimerização em miniemulsão emprega a dispersão do monômero em água, de acordo com protocolos reacionais específicos. Neste trabalho, os protocolos adotados foram baseados nos trabalhos de LANDFESTER (2009), PEIXOTO *et al.* (2016), e CAMPOS, FERRAZ e PINTO (2016). Para a realização da emulsão, foram preparadas previamente duas fases independentes: uma orgânica e outra aquosa (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016; LANDFESTER, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2016).

A fase aquosa (FA) consistiu de surfactante, agente tamponante, iniciador hidrossolúvel e água. Primeiramente, preparou-se uma solução do iniciador KPS em meio aquoso: cerca de 3 mL de água foram utilizados para solubilização do iniciador, utilizando agitador magnético e uma placa de agitação (modelo C-MAG HS 7, IKA, Staufen, Alemanha). Este sistema foi reservado para uso posterior. Em outro recipiente foi solubilizado o conteúdo remanescente da fase aquosa: o surfactante (SDS), agente tamponante (bicarbonato de sódio) e o restante do volume de água. Este sistema também foi homogeneizado por agitação magnética.

A fase orgânica (FO) era composta por monômero(s), co-estabilizante (hexadecano) e o fármaco (rivastigmina base livre), quando este último era adicionado ao meio de reação. Após pesagem e homogeneização com agitação magnética, o conteúdo do recipiente contendo a FO foi vertido no recipiente da FA e a solução resultante foi pré-emulsificada com agitação magnética a 100 rpm por 5 minutos. Após este intervalo de tempo, foi realizada a emulsificação utilizando sonicador (modelo Vibra Cell VCX 750, Sonics, Connecticut, Estados Unidos da América) de frequência central de 20 kHz, potência máxima de 750 W e amplitude de 40% por 5 min, conforme ilustrado na Figura IV - 1.



Figura IV - 1. Sistema de sonicação utilizado.

Após sonicação, o conteúdo reacional foi vertido no vaso do minirreator (modelo Easy Max 102, Mettler Toledo, Ohio, Estados Unidos da América) para polimerização. Este equipamento, ilustrado pela Figura IV - 2, apresenta sistema automatizado que permite controle de agitação e temperatura por meio do conjunto de controle, equipado com termopar, condensador, camisa térmica e agitador. A capacidade máxima do vaso reacional é de 100 mL; logo, por questões de segurança, foi utilizado um volume reacional de 80 mL.

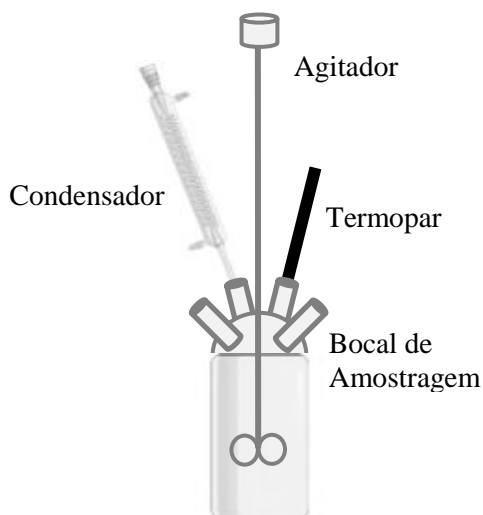


Figura IV - 2. Minirreator de polimerização utilizado nos ensaios, à esquerda.
Esquemática do conjunto de controles utilizados, à direita.

Após adição do meio reacional, ajustou-se o sistema de agitação e de aquecimento para 500 rpm e 80 °C (temperatura recomendada para a polimerização do monômero MMA). Quando o sistema atingia esta temperatura, a solução aquosa do iniciador era adicionada ao sistema reacional, dando início à contagem do tempo de reação.

4.2.1.1. Reação de Miniemulsão para preparo de nanopartículas

De acordo com PEIXOTO *et al.* (2016) e CAMPOS, FERRAZ e PINTO (2016), o uso do comonômero ácido acrílico é responsável pela inserção de grupos funcionais ácidos à cadeia polimérica, os quais podem ser utilizados na posterior etapa de funcionalização da nanopartícula. CAMPOS, FERRAZ e PINTO (2016) variaram a proporção de ácido acrílico de 7 %m/m a 15 %m/m em relação à fase orgânica do meio reacional, para produzir P(MMA-co-AA) com a estrutura proposta na Figura IV- 3 (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2016).

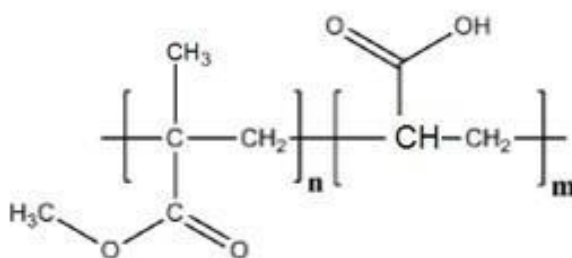


Figura IV - 3. Estrutura esperada do copolímero P(MMA-co-AA).

Neste trabalho, com o objetivo de investigar os efeitos da variação da proporção de AA nas propriedades finais da nanopartícula, foram utilizadas as concentrações mássicas de AA em relação à fase orgânica de 7,5 %m/m, 10 %m/m, 12 %m/m e 15 %m/m. Para simplificação, os látices produzidos foram nomeados como P(MMA-co-AA)7,5%, P(MMA-co-AA)10%, P(MMA-co-AA)12% e P(MMA-co-AA)15%, respectivamente.

Adicionalmente, visando a estabelecer uma base de comparação para avaliar modificações estruturais provocadas pela copolimerização e encapsulamento de rivastigmina base livre (etapas futuras do estudo), escolheu-se por polimerizar o monômero MMA puro, nomeado como PMMA puro. A composição do meio reacional para cada ensaio de copolimerização está disposta na Tabela IV - 1.

Tabela IV - 1. Composições do meio reacional usadas para conduzir as polimerizações em miniemulsão de PMMA e copolímeros.

		Massa (g)				
Reagente		PMMA puro	P(MMA- co-AA) 7,5% AA	P(MMA- co-AA) 10% AA	P(MMA- co-AA) 12% AA	P(MMA- co-AA) 15% AA
<i>Fase orgânica</i>	MMA	16,00	14,80	14,40	14,08	13,60
	AA	0,00	1,20	1,60	1,92	2,40
	Hexadecano			0,064		
<i>Fase aquosa</i>	Água			64,00		
	Surfactante (SDS)			0,80		
	Bicarbonato de sódio			0,064		
	Iniciador (KPS)			0,08		

As reações transcorreram por 2 horas a 80 °C, e duas alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempo específicos para análise de conversão e determinação dos diâmetros médios de partícula. Os tempos escolhidos foram de 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos após o início da reação. A primeira alíquota foi mantida a temperatura ambiente para análise de tamanho, enquanto a outra foi reservada em recipiente de vidro contendo solução aquosa de hidroquinona 1 %m/m, permitindo a determinação de conversão por meio de análise gravimétrica.

A amostra contendo a solução aquosa de hidroquinona foi seca em estufa de circulação de ar a 80 °C (Quimis, Diadema, Brasil) juntamente com uma alíquota de aproximadamente 5 mL retirada e disposta em placa de Petri após o término da reação. Isto objetivou obter nanopartículas secas para realização de outras análises estruturais, como as análises de distribuição de massas molares, de espectroscopia na região do infravermelho e de espectroscopia por ressonância magnética nuclear.

4.2.1.2. Reação de Miniemulsão com encapsulamento de 0,5% de fármaco

A fim de avaliar se a adição do fármaco no meio reacional poderia modificar a cinética de conversão do monômero ou a estrutura da nanopartícula final, foram realizados ensaios de encapsulamento *in situ* em MMA puro e em copolímeros (10 %m/m e 12 %m/m de AA). Escolheu-se utilizar a proporção de 0,5 %m/m de fármaco em relação a fase orgânica (16 g) para obter uma concentração final encapsulada de 1 g de fármaco por litro de látex, considerando-se 100% de encapsulamento. A adição do fármaco foi realizada na etapa de pesagem da fase orgânica, onde foram adicionados 0,08 g de rivastigmina base livre, conforme explicitado na Tabela IV - 2. Os látices obtidos foram nomeados como PMMA + 0,5%R, P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R e P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R.

Tabela IV - 2. Composições de meio reacional nas polimerizações em miniemulsão contendo 0,5 %m/m de fármaco.

	Reagente	Massa (g)		
		PMMA + 0,5%R	P(MMA- co-AA) 10% + 0,5%R	P(MMA- co-AA) 12% + 0,5%R
<i>Fase orgânica</i>	MMA	16,00	14,40	14,08
	AA	0,00	1,60	1,92
	Hexadecano		0,064	
	Rivastigmina		0,08	
<i>Fase aquosa</i>	Água		64,00	
	Surfactante (SDS)		0,80	
	Bicarbonato de sódio		0,064	
	Iniciador (KPS)		0,08	

Ao contrário das reações de polimerização descritas na seção anterior, a duração desta reação foi de 1 hora a 80 °C, excetuando-se apenas a reação conduzida com MMA puro, que transcorreu por 2 horas. Também foram retiradas alíquotas no decorrer da reação (5, 10, 20, 30 e 60 minutos do início da reação) para análise de conversão e determinação dos diâmetros médios de partícula. Uma amostra de 5 mL foi seca em estufa de recirculação a 80 °C, seguindo o mesmo protocolo detalhado anteriormente.

4.2.1.3. Aumento do Percentual Mássico de Fármaco Encapsulado

Para determinar o maior percentual mássico possível de encapsulamento de rivastigmina base livre em copolímero P(MMA-co-AA), estudos foram efetuados variando a composição da reação. As proporções mássicas de fármaco estudadas foram de 1 %m/m, 1,5 %m/m e 2 %m/m em relação à fase orgânica total, enquanto a composição de comonômero variou em 7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m de ácido acrílico em relação à fase orgânica. Novamente, o encapsulamento em PMMA puro foi realizado para fins de comparação. Os látices produzidos foram nomeados como: PMMA + 1%R, P(MMA-co-AA)10% + 1%R, P(MMA-co-AA)12% + 1%R; PMMA + 1,5%R, P(MMA-co-AA)7,5% + 1,5%R, P(MMA-co-AA)10% + 1,5%R e P(MMA-co-AA)7,5% + 2%R. As composições estudadas estão explicitadas na Tabela IV - 3.

Tabela IV - 3. Composição de meio reacional para investigação do aumento do percentual mássico de fármaco encapsulado.

		Massa (g)						
		1% Rivas		PMMA +1,5% R	1,5% Rivas		2% Rivas	
Reagente	PMMA + 1%R	P(MMA-co-AA) 10% +1%R	P(MMA-co-AA) 12% +1%R		P(MMA-co-AA) 7,5% +1,5%R	P(MMA-co-AA) 10% +1,5%R	P(MMA-co-AA) 7,5% +2%R	
<i>Fase orgânica</i>	MMA	16	14,4	14,08	16	14,8	14,4	14,8
	AA	0	1,6	1,92	0	1,2	1,6	1,2
	Hexadecano				0,064			
	Rivastigmina		0,16			0,24		0,32
<i>Fase aquosa</i>	Água				64			
	Surfactante (SDS)				0,8			
	Bicarbonato de sódio				0,064			
	Iniciador (KPS)				0,08			

Analogamente as reações de encapsulamento anteriores, as reações transcorreram por 1 h a 80 °C com tempos determinados para retirada de alíquotas de 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos de reação. Nestes intervalos determinados foram retiradas duas amostras: uma para cálculo de conversão e outra para análise de tamanhos médios de partícula, seguindo os mesmos procedimentos anteriores. Da mesma maneira, após o término da reação, uma amostra de 5 mL do látex obtido foi seca em estufa de recirculação a 80 °C para secagem para realização de outras análises estruturais.

4.2.2. Ensaio de Funcionalização de Copolímeros com Lisina e TAT

A imobilização da biomolécula foi conduzida a partir da ligação química entre o grupo ácido carboxílico, presente no copolímero P(MMA-co-AA), com um grupo amina da molécula bioconjugada. Neste estudo foram utilizadas duas biomoléculas diferentes: o aminoácido lisina, como molécula modelo, e o peptídeo TAT.

A metodologia de funcionalização foi baseada no protocolo de imobilização de proteínas de HERMANSON, MALLIA e SMITH (1992), iniciando com uma etapa de ativação e seguida da bioconjugação (HERMANSON; MALLIA; SMITH, 1992). Inicialmente, para a fase de ativação, adicionou-se 1 mL de suspensão de nanopartículas em 1,5 mL de solução de EDC 0,05 mol/L (preparada em tampão fosfato pH 6,7 0,1 M). O sistema foi mantido sob agitação em rotor giratório (modelo Roto-Shake Genie, Scientific Industries, Bohemia, Estados Unidos da América) a 20 rpm durante 2 horas. Posteriormente, o sistema foi centrifugado por 10 min a 6000 rpm (em centrífuga modelo Thermo Scientific Centrifuge-Megafuge 16 R, Termo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) utilizando uma membrana de 100kDa (membrana Ultra-15 Amicon Ultra-15 Millipore 100kDa - UFC910024, Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) a fim de descartar EDC não reagido no permeado e recuperar as nanopartículas na fase retida para a segunda etapa do processo.

A fase da conjugação biológica foi iniciada com a ressuspensão das nanopartículas em 1 mL de tampão fosfato pH 6,8 seguida da adição de 40 mg de lisina e incubação sob agitação por mais 2 horas e 20 rpm. No caso da funcionalização com TAT, no lugar da lisina foram adicionados 450 µL de uma solução TAT (2,5 mg/mL) em tampão fosfato pH 6,8, o equivalente a aproximadamente 1,25 mg do peptídeo.

Em ensaio biológico para avaliação de permeação celular, foi necessário marcar as nanopartículas para leitura em fluorímetro. Para isso, foi escolhido o agente fluorescente ABZ, cuja estrutura apresenta grupamentos amina, permitindo a sua ligação química à nanopartícula seguindo protocolo anterior. Para evitar competição de terminais ácidos com o peptídeo de interesse, foi utilizada a metade da quantidade de TAT em adição a 500 μ L de solução de ABZ (20 mg/mL) em tampão fosfato pH 6,8.

Ao final das duas horas, a fim de remover as biomoléculas não reagidas, o processo de centrifugação em membrana de 100 kDa foi refeito. O retido foi seco em estufa de recirculação a 80 °C para caracterização estrutural, enquanto o bioconjugado não adsorvido foi quantificado no permeado utilizando uma curva padrão em um espectrofotômetro UV-VIS (modelo UV-M51, Bel Photonics, Piracicaba, Brasil). Dessa forma, foi possível determinar a eficiência de funcionalização da nanopartícula.

Para quantificação de lisina não reagida, foi utilizado o reagente OPA: 5 μ l de amostra diluída foram adicionados a 200 μ L de reagente OPA e depois de 2 min a mistura foi lida no comprimento de 340 nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de lisina em tampão tetraborato de sódio (pH 9,7). Já o TAT não adsorvido foi quantificado por método *Bradford*. Nesse caso, 100 μ L de amostra foram adicionados a 1 mL de reagente *Bradford*. Após 10 min, a mistura foi lida a 595 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão de BSA em água, em que a proteína foi utilizada como proteína modelo para quantificação. O procedimento experimental para a funcionalização das nanopartículas está esquematizado na Figura IV - 4.

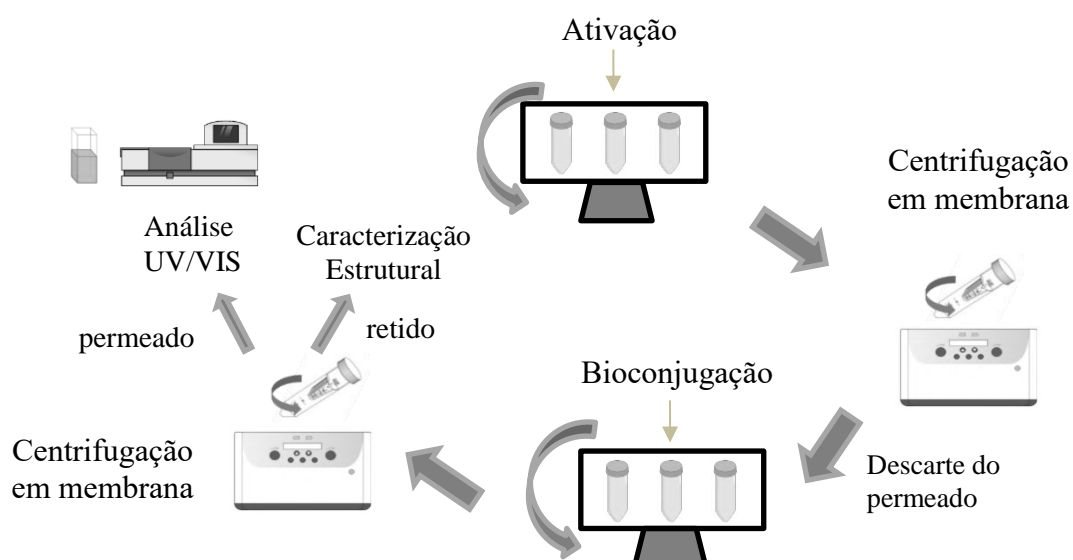


Figura IV - 4. Procedimento experimental adotado para a funcionalização de nanopartículas.

4.2.3. Caracterização das Nanopartículas

Para a caracterização do látex produzido, foram utilizadas técnicas para análise de diâmetro de partícula, carga superficial, eficiência de encapsulamento, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia magnética nuclear, distribuição de massas molares e cálculo de conversão.

4.2.3.1. Diâmetro de Partículas e Potencial Zeta

A caracterização de tamanhos médios de partícula e determinação de potencial zeta foi realizada utilizando o analisador modelo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Para determinação de diâmetro de partícula, 2 gotas da amostra do minirreator foram inseridas em cubeta de vidro específica onde foi adicionada água destilada em quantidade suficiente para chegar ao volume mínimo para a realização da análise.

O tamanho médio de partículas foi calculado a partir do espalhamento dinâmico da luz, provocado pela distribuição diferenciada do feixe de luz emitido pelo equipamento ao atravessar a amostra e chocar com material particulado suspenso. Assim, pela relação de Stokes consegue-se calcular o diâmetro das partículas (HACKLEY; CLOGSTON, 2015). Neste trabalho, foi selecionada a configuração automática do aparelho, em que eram realizadas três medidas de 100 leituras. O resultado final obtido para cada ponto analisado foi a média aritmética destas três medições. Finalmente, ao realizar o processamento de todos os pontos, consegue-se uma distribuição do tamanho de partículas como função do tempo de reação para cada reação de polimerização realizada.

O potencial zeta é calculado pelo espalhamento de luz eletroforético, onde a partir da incidência de um campo elétrico é possível calcular a mobilidade eletroforética de partículas em suspensão. Para esta análise, 1 mL de amostra retirada ao final da reação e diluída em água (1:50) foi inserida em cubeta específica para cálculo do potencial zeta por meio da equação de Smoluchowski (BHATTACHARJEE, 2016). Neste trabalho, foi selecionada a configuração manual com a realização de três medidas com 100 leituras cada. O resultado final foi a média aritmética das três medidas.

4.2.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Nesta análise foi utilizado o equipamento Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) equipado com acessório *Smart Orbit*, que permitiu análise direta do material por meio da aplicação de radiação eletromagnética na amostra sólida. A irradiação deste tipo de radiação pode provocar absorção em certos comprimentos de ondas pela amostra. Certos níveis energéticos podem excitar as moléculas do material, provocando variações do estado energético por conta da alteração da energia eletrônica, vibracional, rotacional e transnacional (CHEREMISINOFF, 1996).

O espectro de bandas de absorção de energia representa um conjunto de variações vibracionais dependentes dos átomos e moléculas da amostra, permitindo identificação de certas estruturas (CHEREMISINOFF, 1996). No caso de ondas na região do infravermelho (0,78 μm e 1000 μm), são observadas frequências vibracionais relacionadas a grupos funcionais, conformação e estrutura de macromoléculas.

Neste trabalho, as análises de FTIR foram realizadas na região do infravermelho médio (4000 – 400 cm^{-1}) em modo de reflexão total e com resolução de 4 cm^{-1} . O espectro final foi resultado de uma média de 128 *scans*, calculados automaticamente pelo equipamento. Dessa forma, foi possível a identificação de grupos funcionais presentes na amostra.

4.2.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A análise de RMN de hidrogênio foi conduzida no equipamento AVIII-500, Bruker (Massachusetts, Estados Unidos da América), usando sonda de 5 mm na frequência de 500 MHz, a partir da solubilização das amostras em clorofórmio deuterado. Esta técnica se fundamenta na reversão do alinhamento de um núcleo atômico gerado a partir da aplicação de um campo magnético. Dependendo da força do campo magnético e do ambiente químico (isto é, das ligações químicas entre o átomo de interesse e da sua vizinhança) muda a quantidade de energia necessária para reverter o alinhamento. Assim, ao determinar os níveis de energia dos núcleos atômicos em uma molécula, pode-se determinar algumas importantes características estruturais do material (CHEREMISINOFF, 1996). Dentre os núcleos mais explorados para a análise, foi escolhido o ^1H devido à sua maior sensibilidade e adequabilidade para análises de P(MMA-co-AA) (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016).

Neste estudo, a técnica de RMN foi utilizada em conjunto com a técnica de FTIR para caracterização dos materiais poliméricos obtidos, identificando os grupos funcionais presentes. Adicionalmente, a análise também pode ser utilizada para avaliar a inserção do comonômero ácido acrílico durante as reações de copolimerização.

4.2.3.4. Distribuição de Massas Molares

Para esta caracterização foi utilizado o cromatógrafo de permeação em gel Viscotek modelo GPC Max VE 2001 (Houston, Estados Unidos da América), acoplado ao detector refratométrico modelo VE 3580 e conjunto de colunas lineares Shodex (modelos KF-48804L e KF-805L de tamanhos máximos de poro de $1,5 \times 10^3$ e 5×10^3 Å). A cromatografia de permeação em gel (GPC) é usada para a separação de polímeros de acordo com o tamanho ou raio hidrodinâmico. Por meio da injeção de uma solução polimérica em um conjunto de colunas específicas, que contém um gel microporoso como fase estacionária, ocorre a separação das moléculas, em função do tamanho das cadeias e da interação com o gel.

Neste trabalho, a solução polimérica foi preparada usando 0,006 g de amostra seca e 1 mL tetrahidrofurano (THF) como solvente. Este também foi utilizado como a fase móvel do sistema na vazão constante de 1,0 mL/min a 40 °C. O equipamento utilizado foi previamente calibrado com padrões de poliestireno com massas molares na faixa de 5×10^3 a 1×10^6 Da. Assim, foi possível obter o valor da massa molar dos polímeros sintetizados.

4.2.3.5. Conversão

A determinação da conversão de monômero foi realizada por meio da técnica de gravimetria. As alíquotas, retiradas em intervalos de tempo especificados, foram dispostas em cadinhos de vidro contendo 5 gotas de solução de hidroquinona 1 %m/m, usada para garantir que não ocorra mais a polimerização. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 80 °C, permitindo evaporar monômero volátil não reagido. Assim, a técnica de gravimetria permite estimar a conversão polimérica por meio da razão entre a massa de amostra seca (polímero + cadinho) e a massa inicial (monômero mais polímero) conforme a Equação 4.1.

$$\%C = \frac{m_{pol\ seco+cadinho} - (m_{cadinho} + m_{hidroquinona})}{\varphi_{orgânica} \times m_{látex}} \quad (4.1)$$

Sendo: %C a conversão calculada, $m_{pol + cadinho}$ a massa seca de polímero e o cadinho, $m_{cadinho}$ é o peso do cadinho vazio, $m_{hidroquinona}$ é a massa do cadinho mais a solução de hidroquinona adicionada, $\varphi_{orgânica}$ é a fração mássica da fase orgânica na reação de polimerização e $m_{látex}$ é o peso da amostra de látex retirada do sistema.

4.2.3.6. *Quantificação de Fármaco Encapsulado*

A determinação de RBL encapsulada foi realizada a partir da quantificação da concentração de fármaco livre. Assim, por meio do balanço de massa do fármaco, conseguiu-se determinar a concentração de fármaco encapsulado. Para isso, foram utilizados os seguintes equipamentos: Espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-M51 (Bel Photonics, Piracicaba, Brasil), Centrífuga Megafuge 16 R Termo Scientific (Massachusetts, Estados Unidos da América) e Membrana Amicon Ultra-15 de Centrifugação Millipore 100kDa UFC910024 (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil).

Primeiramente, foi feito um espectro de varredura de múltiplas concentrações de soluções aquosas de RBL para a construção de uma curva padrão e determinação do comprimento de onda mais adequado para identificação do pico de fármaco. As concentrações utilizadas foram de 0,01 , 0,02 , 0,04 , 0,06 , 0,08 , 0,09 e 0,1 mg/mL. Para a construção do espectro, foi feita uma varredura de 190 a 700 nm. Após a identificação de um pico comum a todas as concentrações, com valor de absorbância menor que 1, foi construída uma curva padrão do fármaco em 263 nm.

Para a determinação de fármaco livre, foram pesados 3 g de látex em membrana Amicon e levados à centrífuga por 20 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi coletado e diluído em água destilada, para que a leitura estivesse abaixo do limite máximo de absorbância da curva padrão. Este procedimento foi realizado três vezes, para garantir a replicabilidade da leitura de absorbância.

Para que a leitura obtida fosse atrelada somente à presença do fármaco, as amostras foram zeradas com amostras de nanopartículas sem fármaco. Assim, para a determinação de rivastigmina na amostra PMMA + 0,5% R foi utilizada a leitura da amostra de PMMA para

zerar, já para P(MMA-co-AA)10% + 0,5% R foi utilizado o P(MMA-co-AA)10% e assim sucessivamente.

4.2.4. Ensaio de Liberação

O experimento de liberação *in vitro* do fármaco encapsulado permite obter uma previsão do comportamento da nanopartícula como sistema de liberação controlada em pH fisiológico. A metodologia empregada buscou obedecer as condições *sink*, para que fosse mantido o mesmo diferencial de concentração, força motriz de liberação do fármaco.

Estes ensaios partem do pressuposto do uso de soluções muito diluídas, quando a liberação do fármaco não está limitada pela sua solubilidade (ABOUELMAGD *et al.*, 2015). Entretanto, o uso de tampão PBS puro como meio de liberação, usado nos artigos relacionados ao encapsulamento de TR, torna-se incompatível com o fármaco hidrofóbico rivastigmina base livre. Para ativos pouco solúveis em água devem ser adotadas algumas estratégias para auxiliar na solubilidade do encapsulado em testes de liberação (ABOUELMAGD *et al.*, 2015; NOUNOU *et al.*, 2006; PANWAR *et al.*, 2010). Dentre elas, destaca-se o uso de surfactantes. Dessa forma, optou-se por adicionar SDS no meio de liberação de PBS pH 7,4 (para se assemelhar ao pH fisiológico) na concentração de 1,25 %m/m (mesma do protocolo de reação de polimerização).

O experimento foi conduzido em bécher coberto com alumínio (devido à fotossensibilidade do fármaco) em banho a 37 °C e com agitação magnética a 100 rpm. No bécher foram inseridos 29 mL de meio de liberação (tampão PBS com SDS) e 1 mL de látex de P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5% R totalizando 30 mL. Este volume pode ser justificado já que ao assumir 100% de liberação, a leitura obtida ainda estaria dentro dos limites da curva padrão realizada em HPLC. Nos tempos de 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 24h, foram retiradas alíquotas de 2 mL, que foram substituídas por 2 mL de meio de liberação. As alíquotas foram centrifugadas em Membrana Amicon Ultra-15 de Centrifugação Millipore 100 kDa UFC910024 (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) a 6000 rpm por 5 min e o permeado foi levado para análise em HPLC (Prominence DGU-20A5, Shimadzu, Rio de Janeiro, Brasil).

A quantificação de fármaco liberado foi feita a partir de uma curva padrão do fármaco em água deionizada (0,0025 a 0,05mg/mL) que relacionava a área do pico de tempo de retenção com a concentração do fármaco. Para a análise no HPLC, foi utilizada coluna C18,

detector de UV a 263 nm, temperatura da coluna a 30 °C, fase móvel de acetonitrila:água acidificada com ácido fosfórico 1 mM (60:40), fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 50 µL. O experimento foi conduzido em triplicata para garantir reprodutibilidade e cálculo de erros estatísticos.

4.2.5. *Ensaio de Citotoxicidade e Permeabilidade Celular*

As análises de toxicologia e de capacidade de permeação de nanopartículas em membrana plasmática apresentam importância significativa, levando-se em conta a aplicação desejada do nanomaterial. Entretanto, não há disponível na literatura uma metodologia padronizada para a condução de análises *in vitro* com nanopartículas. Assim, neste estudo foram desenvolvidos protocolos específicos adaptados da literatura.

Para estes ensaios, foram utilizadas células epiteliais do cólon humano (Caco-2). A escolha desta linhagem está justificada pela presença das mesmas características das células endoteliais cerebrais, como a formação de monocamadas confluentes e de *tight junctions* (JONES; GRAINGER, 2009), podendo ser utilizada como modelo de estudo de transporte membranares de materiais e substâncias.

Ambos os ensaios foram conduzidos no laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ). O estudo com esta linhagem celular pode ser dividido em duas etapas: ensaio de citotoxicidade e o ensaio de permeabilidade celular. O primeiro ensaio objetivou calcular a concentração citotóxica de 50% (CC50), quando é observado 50% de morte celular, a partir de exposição a diferentes formulações de nanopartículas sintetizadas. Dessa forma, conseguiu-se estabelecer um limite de concentração segura para a realização do teste de permeabilidade celular. Este último visou analisar a influência da funcionalização das nanopartículas com o peptídeo TAT na passagem através de barreira plasmática celular.

4.2.5.1. *Ensaio de Citotoxicidade*

Para manutenção celular, a linhagem Caco-2 (ATCC HTB-37TM) foi cultivada em estufa com atmosfera de 5 %v de CO₂ a 37 °C em frascos de cultura de 75 cm² em meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose e suplementado com 10 %m/m de soro fetal bovino. Para repique semanal, o meio nutritivo era removido e as células lavadas três vezes com PBS pH 7,4. Posteriormente, as culturas foram submetidas a dissociação enzimática com tripsina

0,01 %m/m e EDTA 0,01% m/m, pH 7,2 em PBS, por 5 minutos a 37 °C. Após este intervalo de tempo, as células isoladas foram recolhidas em meio nutritivo DMEM com glicose e soro bovino para contagem celular em câmara de Neubauer (Laboroptik, Lancing, Reino Unido) (SILVA, 2014).

Após contagem celular, as células isoladas foram semeadas em placas brancas de 96 poços e fundo transparente na densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço e mantidas em estufa a 37 °C e 5 % vol de CO₂ durante quatro dias para atingir 100% de confluência (SILVA, 2014). Posteriormente, o meio nutritivo foi retirado e substituído por um novo meio de cultura: látex polimérico diluído em meio de cultura. Cabe ressaltar que as nanopartículas foram previamente esterilizadas em luz UV por 30 minutos em fluxo laminar. Foram realizadas oito diluições (fator 3) de nanopartículas, partindo de 250 µg/mL de rivastigmina encapsulada até 0,11 µg/mL em volume final de 200 µL/poço. Como comparativos, foram feitos 4 poços de controle celular (em que não houve a inserção de nanopartículas), 4 poços de controle celular diluído (em que o meio de cultura foi diluído em água na mesma concentração, quando inserida nanopartículas) e controle do fármaco (em que utilizou o fármaco puro na mesma concentração estudada nas nanopartículas). Após semear as nanopartículas, a placa de cultura foi cultivada em estufa a 37 °C e 5 % vol de CO₂ por 72 h. As formulações de nanopartículas escolhidas foram PMMA puro, PMMA +1,5% R, P(MMA-co-AA) 7,5% e P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5% R. Dessa forma, foi possível avaliar discrepâncias de comportamento citotóxico do fármaco puro e das nanopartículas, assim como entre as próprias nanopartículas, levando em consideração a inserção do copolímero e do fármaco encapsulado.

Após as 72 h, a viabilidade celular foi verificada a partir da incubação de células com 20 µL do kit Celltitter Glo por 2 minutos sob agitação seguida da leitura em microscópio de luminescência (Leitor FlexStation® 3, Molecular Devices, California, Estados Unidos da América). A viabilidade celular foi avaliada por meio da leitura de luminescência proporcional a quantidade de ATP celular. O cálculo da CC₅₀ foi determinado por meio de regressão linear, tomando-se o controle celular como 100% viável. Para este experimento, foram utilizadas duplicatas biológicas em cada placa, sendo que o experimento completo totalizou três repetições de placa da 96 poços. O procedimento experimental completo pode ser visualizado no esquema abaixo (Figura IV - 5).

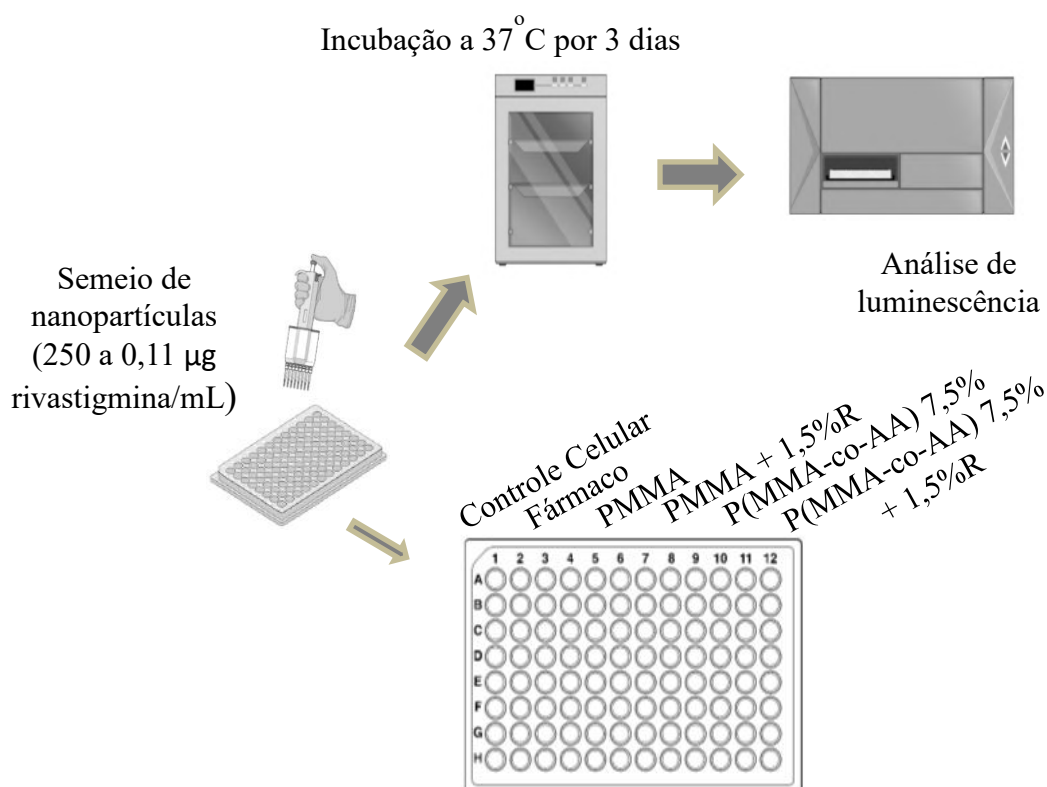


Figura IV - 5. Procedimento experimental usado para o ensaio de citotoxicidade com células Caco-2.

4.2.1.1. Ensaio de Permeabilidade Celular

O protocolo adotado foi baseado no estudo de permeabilidade de nanopartículas de 50 nm reportado por RAGNAIL *et al.* (2011) devido a proximidade do tamanho de nanopartículas obtido aqui (RAGNAILL *et al.*, 2011). Assim, para o ensaio de permeabilidade, as células foram cultivadas em placas cobertas com alumínio, com membranas de policarbonado *Transwell* (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) na densidade de 2×10^5 células/poço durante 3 dias, até confluência completa. Após esse período, as culturas foram incubadas por 4 horas com 100 µg de nanopartícula/mL em volume final de 300 µL no compartimento superior (RAGNAILL *et al.*, 2011). As nanopartículas foram previamente esterilizadas em luz UV, conforme descrito anteriormente, e o processo de bioconjugação com TAT e fluorófilo ABZ foi realizado de forma estéril em fluxo laminar para impedir contaminação biológica.

As amostras utilizadas foram P(MMA-co-AA) 7,5%, P(MMA-co-AA) 7,5% com TAT, P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R, e P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R e TAT, funcionalizadas com fluorófilo ABZ. Como controles comparativos, foram feitos o controle de cultura (cultura celular sem adição de nanopartículas), controle de membrana (uso de

P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R sem barreira celular) e os controles positivos das amostras sem TAT (CP₁ para controle de P(MMA-co-AA) 7,5% e CP₂ para P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R). Os controles positivos foram obtidos a partir de um pré tratamento com reagente EDTA 2 mM a 37°C durante 3 h com o objetivo de desfazer as junções *tight* entre células para garantir máximo transporte possível.

Após as 4 horas de experimento, foram retiradas amostras de 100 µl dos compartimentos superior e inferior, seguida da leitura de fluorescência em espectrômetro SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, California, Estados Unidos da América). Para cálculo do percentual migratório, foram tomados como 100% o somatório das leituras superior e inferior. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica. Adicionalmente, foram tiradas micrografias de culturas fixadas em lamínulas (a partir do tratamento prévio com 4 % m/m de paraformaldeído) para avaliar a morfologia das junções *tight* após o experimento.

Capítulo V

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões do trabalho serão apresentados na seguinte ordem: 1) Preparo de Nanopartículas, 2) Encapsulamento de 0,5% de fármaco, 3) Funcionalização de copolímeros com lisina e TAT, 4) Aumento do percentual mássico de fármaco encapsulado, 5) Funcionalização de copolímeros com lisina, 6) Ensaio de Liberação e 7) Estudos *in vitro*.

5.1. Preparo de Nanopartículas

Nesta primeira etapa do estudo, foram investigadas as possíveis alterações estruturais provocadas pela inserção do comonômero ácido acrílico durante a reação de polimerização. Para isso, o látex produzido foi caracterizado de acordo com a conversão, diâmetro médio de partículas, carga superficial, distribuição de massas molares e estrutura química (por meio das técnicas de FTIR e RMN).

5.1.1. Conversão

Por meio da técnica gravimétrica, pode-se criar o perfil de conversão do polímero formado com o tempo de reação. Como esta caracterização foi realizada ao longo de todas as reações de polimerização efetuadas, foi possível realizar análises comparativas dos perfis de conversão levando-se em consideração as alterações no meio reacional.

Considerando o fato que o comonômero escolhido, AA, também pode polimerizar, formando o PAA, não há como garantir a princípio uma copolimerização 100% efetiva. Além disso, ao contrário do polímero PMMA, o PAA apresenta caráter hidrofílico, solubilizando parcialmente na água. Por isso, é possível que apareçam alterações na cinética de polimerização e não somente na estrutura química do látex sintetizado. A polimerização de MMA puro teve como objetivo sintetizar uma nanopartícula de referência, já que as alterações para incorporação de fármaco e de um segundo monômero foram realizadas neste meio reacional.

A Figura V - 1 apresenta os perfis de conversões obtidos para as reações de homopolimerização e de copolimerização do MMA. Foram observados valores sempre próximos de 100% de conversão. Valores maiores que 100% são devidos a evaporação incompleta da água. A Figura V – 1 mostra que as reações são muito rápidas, essencialmente completas, não sendo necessário mais do que 60 minutos para o término da reação.

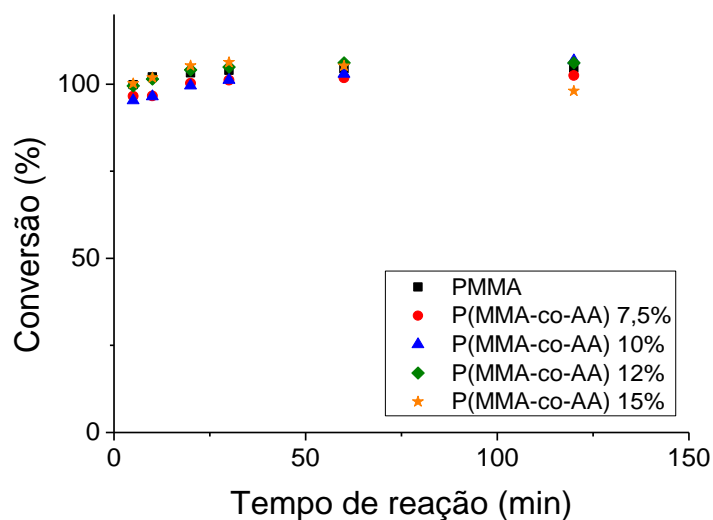


Figura V - 1. Conversão da reação de polimerização via miniemulsão para obtenção de PMMA e copolímeros.

Pode ser observado na Figura V - 1 que os percentuais mais baixos de AA (7,5 %m/m e 10 %m/m) levam a curvas ligeiramente mais lentas no início, ao contrário do observado com percentuais mais elevados de AA (12 %m/m e 15 %m/m). Este fato é devido à elevada reatividade do AA e preferencial solubilidade do AA na água (HOLZAPFEL *et al.*, 2005). Entretanto, todas as composições estudadas atingiram altos valores de conversão em menos de 60 minutos, indicando que não houve alteração significativa da polimerização de referência do MMA.

Todavia, é importante ressaltar que a composição de 15 %m/m de AA causou um resultado diferenciado. Conforme explicitado na Figura V - 2, o látex obtido não apresentou as mesmas características macroscópicas daqueles obtidos nas demais reações de copolimerização. A partir de 45 minutos de reação, foram observadas aglomerações poliméricas no vaso reacional, que foram se tornando maiores e mais numerosas com o passar do tempo de reação.



Figura V - 2. Detalhe da aglomeração formada na reação de copolimerização P(MMA-co-AA)15%.

As aglutinações podem ser possivelmente explicadas pela ocorrência de nucleação homogênea. Esta pode ocorrer quando há formação de polímero na fase aquosa. Quando o polímero formado atinge seu valor máximo de solubilidade, o polímero precipita e forma partículas. De acordo com PEIXOTO *et al.* (2016), este mecanismo pode ocorrer em reações de miniemulsão, dependendo das solubilidades do monômero, polímero e iniciador na fase aquosa. Em casos em que são utilizados monômeros hidrofílicos muito solúveis em água, exatamente o caso do ácido acrílico, o mecanismo é mais atuante devido as altas concentrações poliméricas na fase aquosa (PEIXOTO *et al.*, 2016). A precipitação de polímero não estabilizada pode promover a aglomeração desenfreada das partículas formadas.

HOLZAPFEL *et al.* (2005) também observaram a formação de blocos poliméricos durante a copolimerização de estireno e ácido acrílico em miniemulsão. Em meios reacionais de baixo pH e alta concentração de ácido acrílico, ocorreu a formação de blocos de PAA na interface entre as fases aquosa e orgânica. Isto pode causar um aumento do volume das partículas resultante do inchamento de PAA, altamente hidrofílico, formando

aglutinação polimérica. De acordo com HOLZAPFEL *et al.* (2005) este fato foi mais pronunciado em reações de copolimerização que utilizam concentração mássica de AA superior a 10% (HOLZAPFEL *et al.*, 2005), como no presente trabalho.

Além disso, dois outros mecanismos não podem ser descartados. Um diz respeito ao aumento de viscosidade da fase aquosa, por conta do acúmulo de PAA solúvel na água (CHEVREL *et al.*, 2014), que pode causar aglomeração. Outro diz respeito à formação de cadeias poliméricas ricas em PAA que se acumulam na superfície e se estendem no seio da solução aquosa, formando partículas cabeludas (*hairy polymers*) (KIRILLOVA *et al.*, 2014). Os ramos que se estendem na água partem de diferentes partículas e podem se entrelaçar, causando aglomeração.

Concluiu-se que em quaisquer dos cenários considerados, utilizando baixas concentrações de AA (como 7,5 %m/m, 10 %m/m e até 12 %m/m), não são observadas modificações expressivas na conversão de monômero nem na estabilidade de emulsão. Entretanto, ao adicionar 15% de AA, notou-se a formação de estruturas aglomeradas causadas pela polimerização de PAA, indesejada neste trabalho.

5.1.2. Diâmetro de Partícula e Potencial Zeta

A caracterização dos tamanhos de partícula apresenta grande importância para produção de materiais em escala nanométrica, visto que esta é uma propriedade relevante para garantir a segurança do uso. De acordo com ELSABHY e WOOLEY (2013), os materiais devem apresentar tamanho característico entre 10 e 100 nm para cumprirem o objetivo terapêutico sem provocar reações adversas e indesejadas (ELSABHY; WOOLEY, 2013). De acordo com o exposto anteriormente, observou-se a necessidade de desenvolver formulações com nanopartículas menores, visto que a grande maioria dos artigos levantados sintetizou partículas com tamanhos superiores a 150 nm. No presente trabalho, o uso de polimerização em miniemulsão visou a diminuição de tamanhos característicos das nanopartículas, além de permitir a obtenção de uma distribuição mais homogênea de tamanhos.

Durante as reações de polimerização realizadas, foram coletadas amostras para avaliação de alteração de diâmetro de partícula ao longo do tempo. As distribuições de diâmetro de partícula com o tempo de reação para cada reação estão na Figura V – 3.

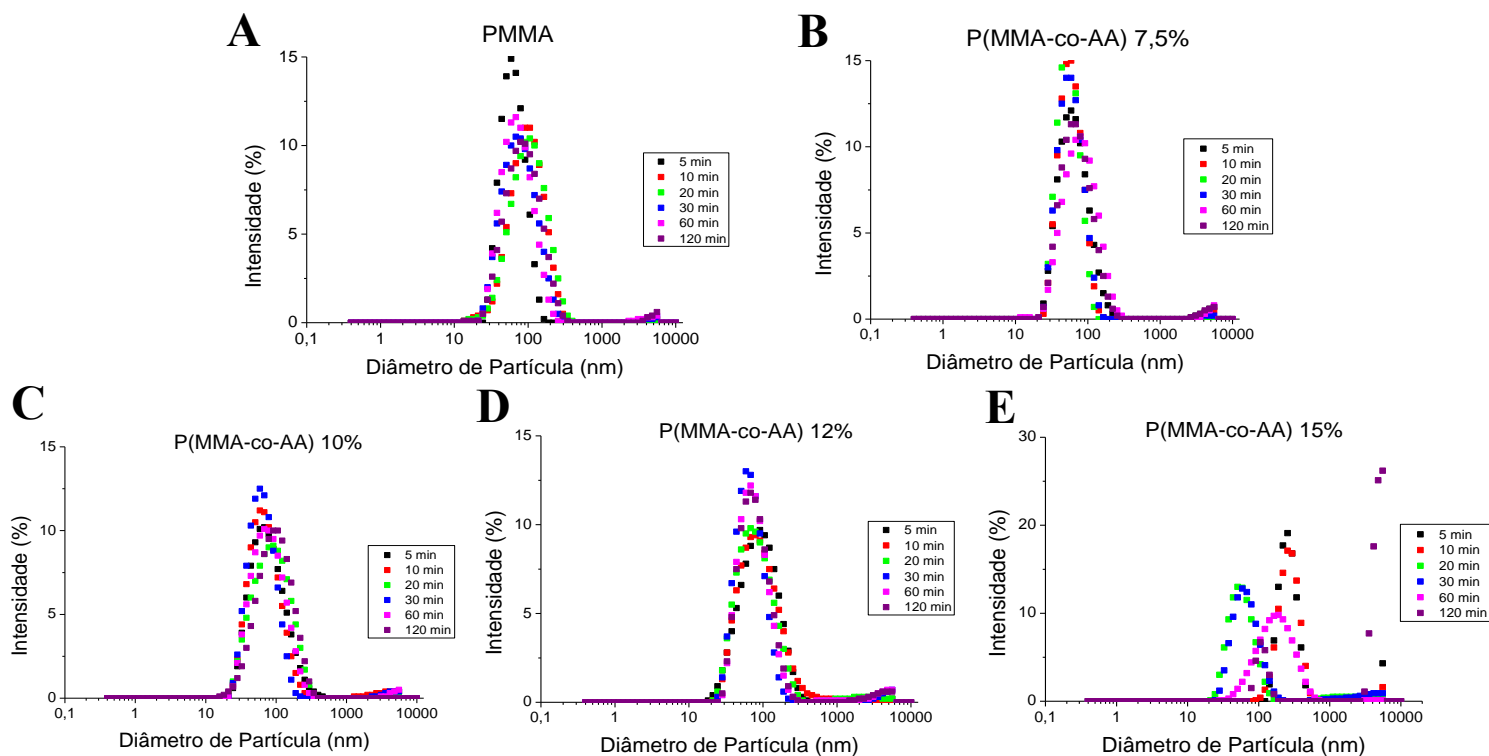


Figura V - 3. Evolução das distribuições de diâmetros de partícula para PMMA e copolímeros.

Observando a Figura V - 3, nota-se a formação de um perfil essencialmente monodisperso, estreito e constante desde o início da reação. Este resultado já era esperado, devido às características do processo de polimerização em miniemulsão adotado. Isto é um fator interessante do ponto de vista de produção em larga escala, já que os produtos são muito semelhantes entre si. A constância das distribuições de tamanho mostra que não ocorrem mecanismos muito relevantes de formação e aglomeração de partículas durante o processo, o que ajuda a validar a receita proposta.

A única exceção obtida foi na reação de copolimerização conduzida com 15 %m/m AA (Figura V - 3 E). Os perfis observados indicam a ocorrência de aglomeração de nanopartículas, corroborando as observações anteriores.

Na Tabela V - 1 foram expostos os valores médios dos diâmetros de partícula e de carga superficial das amostras finais, depois de decorridos 120 minutos de reação.

Tabela V - 1. Diâmetro médio de partículas e potencial zeta obtidos para PMMA e copolímeros.

	Diâmetro médio de Partículas (nm)	PDI ²³	Potencial Zeta (mV)
PMMA	76,64	0,229	-46,8
P(MMA-co-AA) 7,5%	64,55	0,216	-45,8
P(MMA-co-AA) 10%	81,82	0,217	-41,7
P(MMA-co-AA) 12%	72,42	0,216	-40,8
P(MMA-co-AA) 15%	536,70	1,000	indefinido

De acordo com a Tabela V – 1, nota-se que as nanopartículas formadas apresentaram diâmetros médios semelhantes, menores que 100 nm e na faixa entre 65 e 80 nm. A única exceção observada foi o caso de copolimerização com 15 %m/m de AA, quando foi observada a presença de aglomerações poliméricas, como já explicado anteriormente. Adicionalmente, observaram-se valores muito baixos de PDI, evidenciando uma vez mais a formação de distribuições de tamanho estreitas e monodispersas, como mostrado na Figura V - 3.

A escolha do iniciador utilizado pode afetar a dinâmica e as características do polímero final obtido. Ao empregar o iniciador hidrofílico KPS, estimula-se o mecanismo de nucleação homogênea, associado à formação de polímero na água. Este fato reforça a hipótese de ocorrência de polimerização de PAA na fase aquosa, sugerindo baixo percentual de copolimerização (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2016). Apesar disso, a funcionalização das partículas não requer concentração expressiva de grupos funcionais na superfície, mesmo que haja a tendência do PAA formado na água se depositar na superfície das partículas.

A análise do potencial zeta permite avaliar a magnitude da carga superficial das nanopartículas e também inferir acerca da estabilidade da dispersão (BHATTACHARJEE, 2016). Alterações de potencial podem ser associadas a modificações na interface sólido-meio por dissociação de grupos funcionais da superfície

²³ Define-se como índice de polidispersão (PDI) a medida da variância relativa da distribuição de tamanhos, calculado a partir da análise cumulativa dos dados.

ou adsorção iônica do meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dessa forma, a partir da análise da Tabela V - 1, pode-se concluir que foram obtidas dispersões poliméricas estáveis devidos aos valores elevados de potencial zeta (acima de 30 mV), indicando estabilidade por repulsão elétrica. Adicionalmente, os valores de potencial negativos podem ser associados ao uso de um surfactante aniônico, que tende a se acumular na superfície polimérica para estabilizar as partículas e evitar a coalescência. Além disso, a dissociação dos grupos carboxílicos superficiais também geram espécies aniônicas, justificando os elevados potenciais zeta negativos. Resultados similares também foram obtidos para copolimerizações de P(MMA-co-AA) conduzidas em estudo anterior (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016)

Por fim, a comparação dos valores obtidos entre PMMA e os copolímeros não indicou alterações superficiais significativas, sugerindo maior influência do surfactante do que do copolímero na carga superficial, como observado anteriormente (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016). Cabe ressaltar também que o valor de potencial não pode ser determinado para o copolímero produzido com 15 %m/m AA, cuja aglomeração impediu a realização desta e de outras análises.

5.1.3. Massa Molar e Estrutura Química

Polímeros são materiais caracterizados pelas altas massas molares médias; por conta disso, as propriedades físico-químicas desses materiais são influenciadas de maneira semelhante com o aumento das massas molares (CANEVAROLO JR., 2006). Dessa forma, foi importante determinar a massa molar das nanopartículas, como forma de caracterização da reação de copolimerização e da qualidade do polímero obtido.

A Tabela V - 2 apresenta os valores de massa molar ponderal média e o índice de polidispersão do homopolímero PMMA e dos copolímeros sintetizados. De acordo com CANEVAROLO JR (2006), as nanopartículas obtidas são consideradas poliméricas, pois possuem massas molares médias superiores a 10 kDaltons, e de alta massa molar, já que possuem massas molares médias superiores a 250 kDa.

Tabela V - 2. Massas molares médias das nanopartículas produzidas.

	Massa Molar (kDa)	PDI
PMMA	1534	2,403
P(MMA-co-AA) 7,5%	1743	3,592
P(MMA-co-AA) 10%	1550	3,768
P(MMA-co-AA) 12%	2099	1,909

Pode-se inferir acerca da incorporação de AA nas cadeias poliméricas por meio da análise das massas molares médias do produto final. Analisando a Tabela V -2, nota-se que copolímeros com 7,5 %m/m e 12 %m/m de AA apresentaram massas molares mais elevadas em comparação com o homopolímero. Para a amostra com 10 %m/m AA, entretanto, foi obtida massa molar muito da próxima do observado para o PMMA, o que poderia indicar baixo percentual de incorporação de monômero. No entanto, o alargamento das distribuições de massas molares, como observado nos polímeros produzidos com 7,5 %m/m e 10 %m/m de AA, são característicos da ocorrência de copolimerização, resultado também obtido em outros estudos (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Outro ponto importante é a distribuição de massas molares (Figura V – 4) que, adicionalmente com o índice de polidispersão calculado, permite inferir que distribuições semelhantes e estreitas foram obtidas. Este fato caracteriza um polímero de longa cadeia carbônica não ramificado, corroborando a hipótese de ocorrência de polimerização radicalar dos monômeros escolhidos neste estudo (CANEVAROLO JR., 2006).

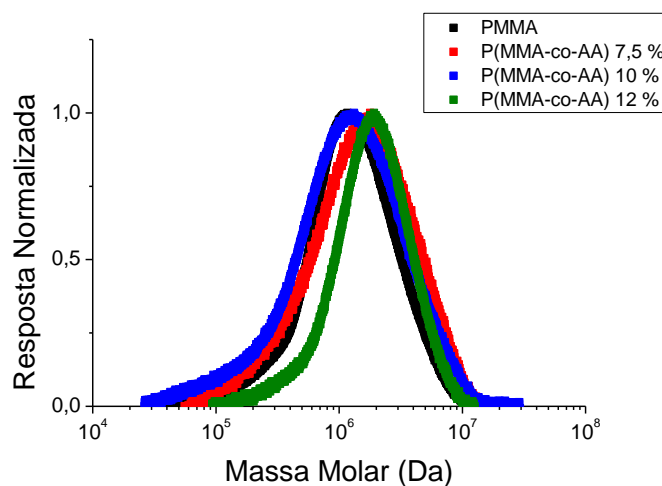


Figura V - 4. Distribuições de massas molares para PMMA e copolímeros.

A análise FTIR pode ser feita a partir da identificação da posição e intensidade dos picos de absorção presentes no espectro, comparando-os com tabelas padrões. A Figura V - 5 apresenta os espectros de absorção no infravermelho obtidos (Figura V – 5 A) assim como comparações gráficas entre eles (Figura V – 5 B, 5 C e 5 D).

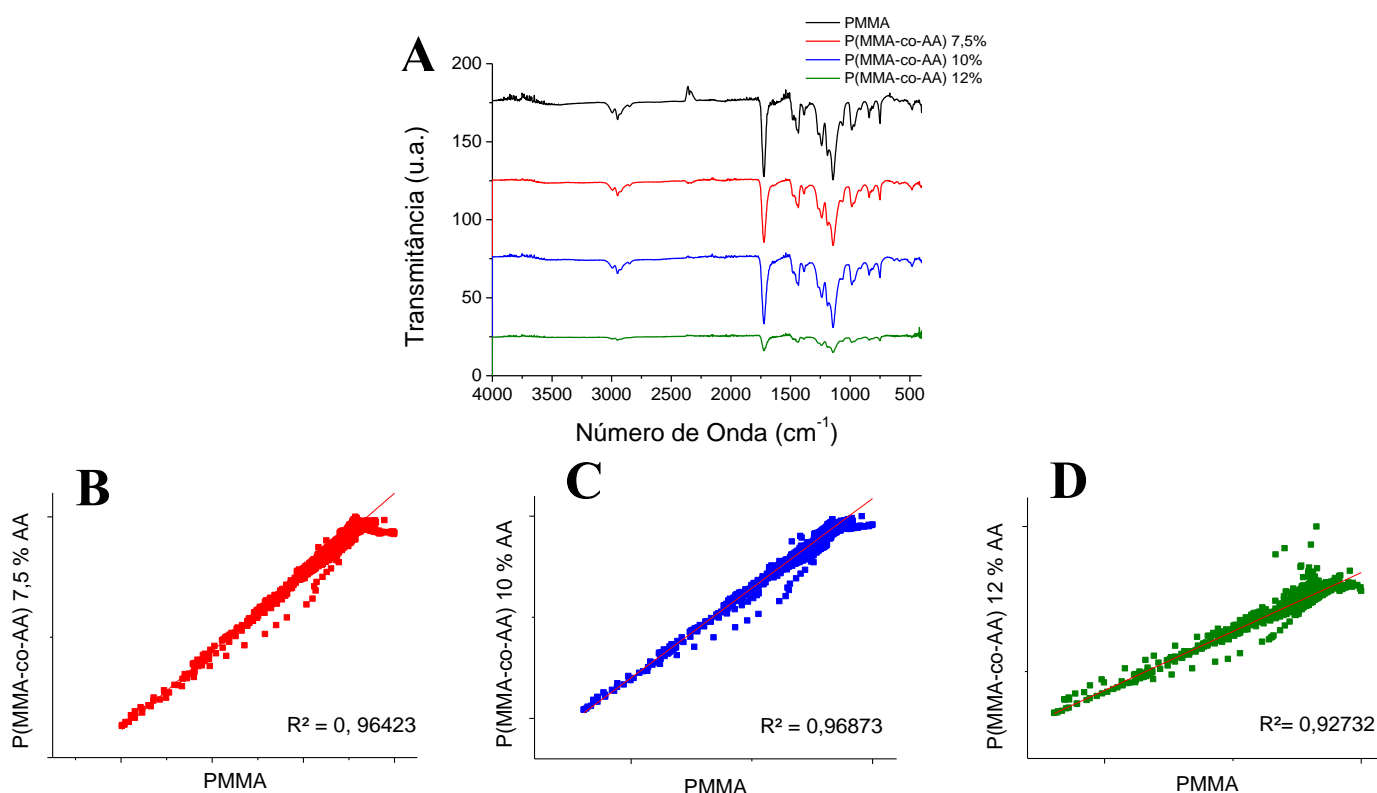


Figura V - 5. Espectros de FTIR obtidos para os polímeros produzidos; (A), comparação gráfica PMMA x P(MMA-co-AA) 7,5% (B), comparação gráfica PMMA x P(MMA-co-AA) 10% (C) e comparação gráfica PMMA x P(MMA-co-AA) 12% (D).

A partir da observação da Figura V - 5A, percebe-se que os espectros obtidos são amplamente dominados pela presença vibracional de ligações do tipo C-O, comportamento típico do PMMA e do PAA. Consegue-se ainda notar a presença de um pico de absorção intenso em aproximadamente 1720 cm⁻¹, indicando estiramento da ligação C=O característico de ésteres, como no caso do homopolímero padrão. Adicionalmente, foram observados picos de absorção nas regiões próximas a 2900 cm⁻¹ e 1100 cm⁻¹, que podem ser atribuídos às ligações O-H (ácido carboxílico) e C-O-C (éster) (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016; CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; RIBEIRO; SOUZA, 2007). Portanto, há grande similaridade entre os espectros obtidos, com exceção do copolímero P(MMA-co-AA) 12%, cuja baixa intensidade foi associada à quantidade reduzida de amostra utilizada na análise.

Outra informação que pode ser obtida pelos espectros de FTIR é o indicativo de baixo percentual de copolimerização. Como o grupo ácido carboxílico apresenta banda larga de absorção na região 3300-2500 cm^{-1} (RIBEIRO; SOUZA, 2007), poderia ser esperado alguma absorção nesta faixa no espectros dos copolímeros. Entretanto, como observado na Figura V – 5 A, esta banda não está presente, sugerindo baixa copolimerização.

Para melhor observar as singularidades de cada espectro e relacioná-los com o padrão, PMMA, foram realizadas análises comparativas entre a intensidade de absorção de PMMA e a dos copolímeros (Figura V – 5 B, 5 C e 5 D). Ao analisar os índices de correlação linear (R^2) calculados, vê-se que há alteração estrutural provocada por copolimerização, já que o valor de R^2 obtido foi sempre significativamente diferente de 1. Além disso, as amostras com 7,5 %m/m e 10 %m/m apresentaram R^2 muito semelhante, sugerindo um mesmo percentual de copolimerização. A amostra P(MMA-co-AA) 12 %m/m apresentou menor R^2 , indicando que o aumento percentual do conteúdo de comonômero causa maior discrepância estrutural entre o polímero padrão e o copolímero formado. Esses resultados parecem atestar uma vez mais a ocorrência de copolimerização entre o MMA e o AA.

As Figuras V – 5 B a 5 D evidenciaram a presença de intensidades diferenciadas em certas regiões espectrais, como na região aproximadamente 1700-1760 cm^{-1} , correspondente à ligação C=O de ácido carboxílico. Dessa maneira, pode-se identificar a presença deste grupo funcional na estrutura do copolímero, mesmo que em baixa quantidade, o que também evidencia a incorporação de AA na estrutura.

Portanto, a análise de FTIR indicou que ocorreu copolimerização, porém possivelmente em baixo teor. Dessa forma, conduziu-se a análise de RMN com o objetivo de calcular o percentual de AA copolimerizado. A Figura V - 6 apresenta os espectros de RMN obtidos para o PMMA e os copolímeros.

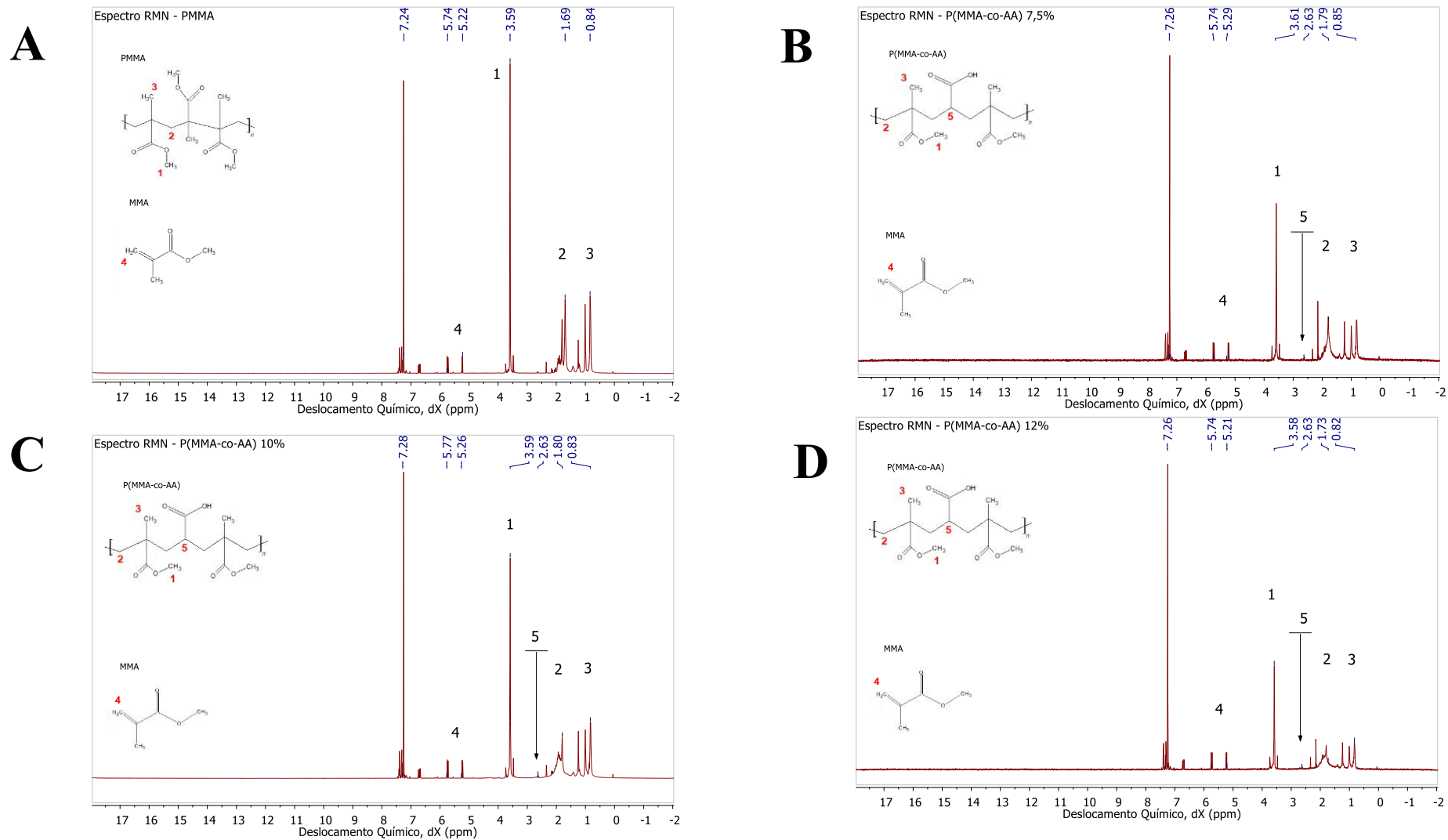


Figura V - 6 . Espectros de RMN obtidos para PMMA (A), P(MMA-co-AA) 7,5% (B), P(MMA-co-AA) 10% (C) e P(MMA-co-AA) 12% (D).

Em todos os espectros de RMN obtidos foram observados picos relacionados ao solvente clorofórmio (aproximadamente $\delta=7$ ppm) e a estrutura de PMMA. Em $\delta=3,6$ ppm está presente o singlete associado ao deslocamento químico do grupo éster O-CH₃, marcado na fórmula estrutural como 1. Em $\delta=1,6-2,0$ ppm e $\delta=0,8-1,0$ ppm estão localizados os picos atribuídos aos hidrogênios do grupo metileno e metila, ilustrados como 2 e 3 respectivamente (CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999). Em $\delta=5,2-5,7$ ppm encontra-se o sinal duplete da ligação dupla CH₂, pertencendo somente ao monômero MMA (marcado como 4). Assim, foram observados vestígios de monômero MMA na estrutura polimérica final.

Para o cálculo do percentual mássico de copolimerização efetivo, foi utilizado o sinal do hidrogênio 5, presente somente no copolímero em $\delta=2,3-2,6$ ppm. Tomando-se como referência o sinal obtido pelo hidrogênio do grupo O-CH₃, foi possível estimar o número de mols e, conseqüentemente, o conteúdo do monômero MMA no polímero (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016). Adicionalmente, a quantidade de monômero AA foi calculada a partir do hidrogênio 5, possibilitando o cálculo da porcentagem mássica de AA presente no copolímero total. Para o P(MMA-co-AA) 12% foram obtidos 4 %m/m de AA no copolímero; para P(MMA-co-AA)10% e P(MMA-co-AA) 7,5% foram calculados os percentuais mássicos de 2 %m/m de AA no copolímero.

O uso de maior proporção de AA na reação gerou maior incorporação de AA, o que já era esperado, levando-se em conta a maior quantidade do monômero no protocolo experimental. Já o fato dos polímeros P(MMA-co-AA) 7,5% e P(MMA-co-AA) 10% apresentarem valores similares de incorporação podem estar associados ao uso de quantidades semelhantes na receita e também à evaporação de monômero e possíveis perdas nas pesagem e transferência de recipientes. Outro ponto considerado é que a ocorrência de menores conteúdos de AA no copolímero que na receita original parecem confirmar que parte do AA permanece dissolvido na água.

Estes resultados permitiram concluir que o aumento do teor mássico de AA no protocolo reacional da miniemulsão permitiu elevar a sua incorporação, com concentração limite próxima de 12 %m/m. A partir deste valor, foi observada tendência da homopolimerização de PAA em detrimento da copolimerização com PMMA, devido ao uso de um iniciador hidrossolúvel. Assim, para os próximos ensaios de encapsulamento do fármaco, foi usada a concentração máximo de 12 %m/m de AA.

5.2. Encapsulamento de 0,5 %m/m de Fármaco

Na seção anterior foram estudados os efeitos da adição de um comonômero, AA, na reação de polimerização em miniemulsão, com o objetivo de sintetizar um copolímero com grupamentos funcionais ácidos. Notou-se que o teor máximo possível de AA na reação de AA foi de 12 %AA, apesar de as demais outras formulações também apresentarem características de copolimerização, quando em comparadas com o homopolímero de PMMA.

Nesta seção pretendeu-se avaliar o efeito do encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco na estrutura do látex final. Para isso, foram realizados ensaios de encapsulamento em homopolímero (PMMA + 0,5%R) e em copolímeros produzidos com as maiores proporções de AA no meio reacional (P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R e P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R) para também investigar possíveis interações existentes entre o fármaco e o comonômero.

5.2.1. Conversão

O encapsulamento do fármaco em PMMA visou a alcançar dois objetivos principais. O primeiro objetivo foi o de avaliar se o fármaco influencia o processo de polimerização. O segundo foi o de estabelecer um padrão com homopolímero encapsulado para comparação com os copolímeros. Na Figura V - 7 apresenta-se uma comparação ilustrativa das miniemulsões obtidas com o PMMA puro e com o polímero que contém fármaco encapsulado (PMMA + 0,5%R). Como pode ser observado, não foram encontradas diferenças macroscópicas, sugerindo que a presença do fármaco não interferiu na estabilidade da emulsão precursora.

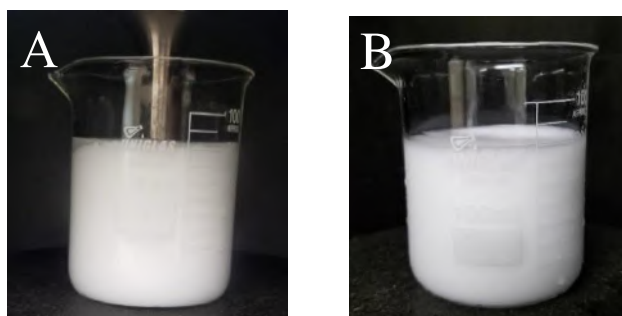


Figura V - 7. Comparativo das miniemulsões obtidas após etapa de sonicação com PMMA puro (A) e com PMMA + 0,5%R (B).

A interferência do fármaco na polimerização do homopolímero pode ser verificada a partir da comparação de cinética de conversão, ilustrada na Figura V - 8.

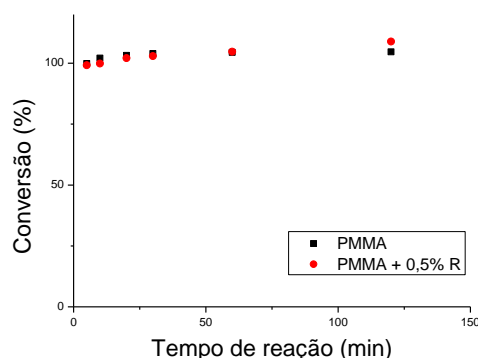


Figura V - 8. Evolução de conversão nas reações de PMMA puro e PMMA + 0,5%R.

De acordo com a Figura V - 8, observou-se que a presença do fármaco no meio reacional não alterou o perfil de conversão do monômero, ou seja, em poucos minutos de reação novamente foram obtidos valores altos de conversão. Assim, não são esperadas alterações de conversão nos experimentos voltados para o encapsulamento. Este resultado é muito importante, porque a introdução de cargas funcionalizadas, como o caso do fármaco, no meio reacional frequentemente causam efeitos inibitórios significativos em reações radiculares (OLIVEIRA *et al.*, 2011, 2012a, 2012b), o que não foi observado aqui.

Avaliando-se as cinéticas de polimerização obtidas anteriormente (Figura V - 1 e 8) foi observado que a conversão completa pode ser alcançada em tempos bem menores que 120 minutos. Este fato possibilitou a redução do tempo da reação de encapsulamento para 60 minutos. Os resultados das curvas de conversão obtidas para as reações conduzidas com 10 %m/m e 12 %m/m de AA estão expostos na Figura V - 9.

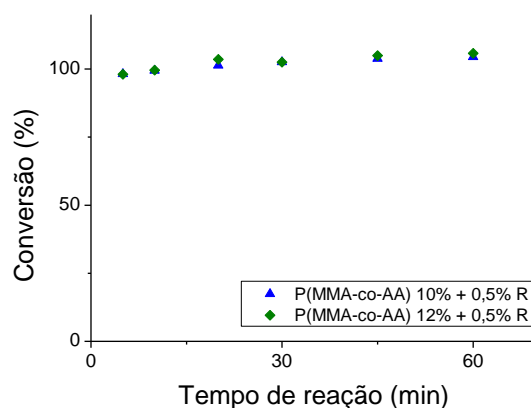


Figura V - 9. Conversão para 10% AA e 12% AA com 0,5 %m/m de fármaco.

Ao analisar a Figura V – 9 acima, nota-se que ambas as curvas apresentaram perfis de conversão semelhantes entre si e com a amostra PMMA + 0,5%R. Adicionalmente, mesmo com redução de tempo reacional, foram obtidas conversões muito próximas de 100%. Dessa forma, conclui-se que, mesmo na presença de AA, 0,5 %m/m de fármaco não exerce qualquer efeito significativo sobre a conversão final do copolímero.

Este resultado é muito importante, tendo em vista o uso de rivastigmina como sal hidrossolúvel na formulação farmacêutica. De acordo com PEREIRA (2007), fármacos muito polares ou hidrossolúveis podem apresentar baixa biodisponibilidade em virtude da permeabilidade reduzida entre membranas plasmáticas, dada a sua natureza lipofílica (PEREIRA, 2007). Sabendo-se que o uso de fármacos muito lipofílicos também pode apresentar limitações, o encapsulamento de rivastigmina base livre, realizado nesta seção, apresenta-se como uma estratégia promissora para formulação de medicamentos mais eficientes.

5.2.2. Diâmetro médio de Partículas e Potencial Zeta

A condução da análise de tamanho de partícula possibilitou verificar se o fármaco influencia o diâmetro final da nanopartícula, cuja importância já foi ressaltada previamente, e a carga superficial. Qualquer modificação destas propriedades pode afetar a estabilidade do látex, assim como na aplicação no produto final, impactando a internalização e penetração celular das nanopartículas (ELSABAHY; WOOLEY, 2013).

As distribuições de diâmetros de partícula obtidas para as reações de encapsulamento estão dispostas na Figura V - 10, juntamente com uma réplica da distribuição de PMMA (Figura V – 10 A) para melhor comparação.

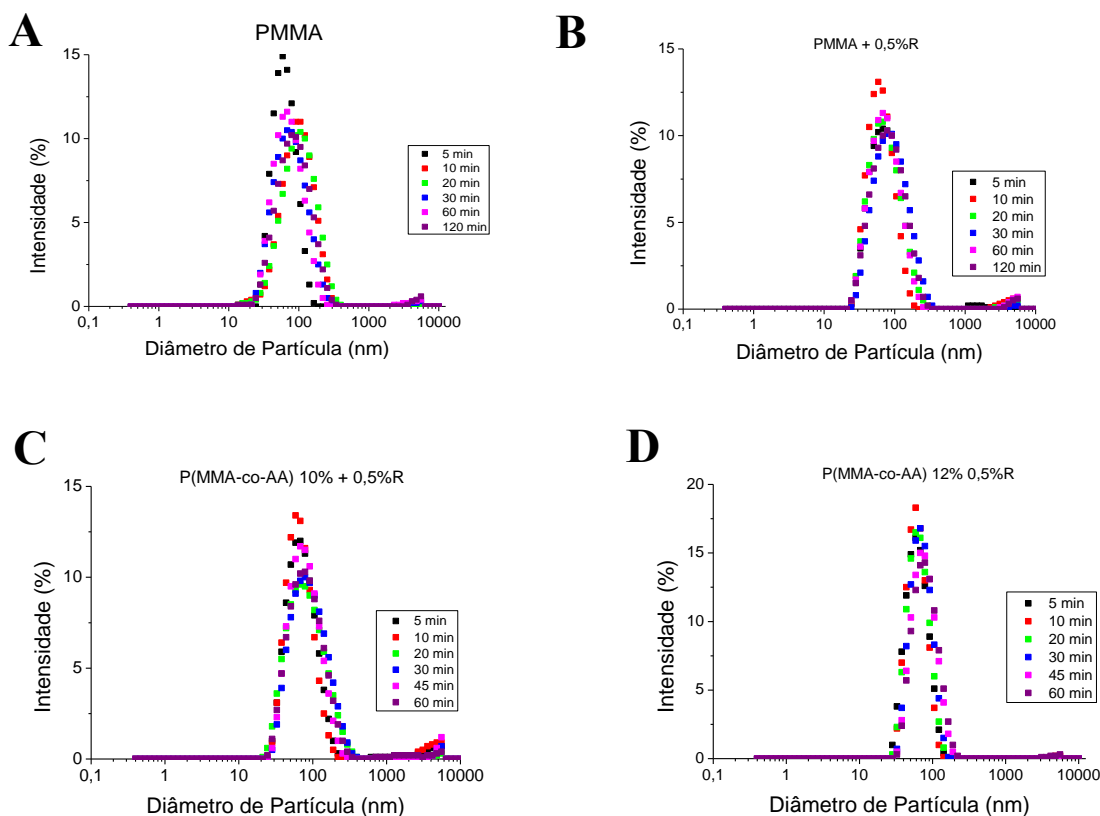


Figura V - 10. Distribuições de diâmetros de partícula para reações que visavam ao encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco.

Ao analisar a Figura V - 10, observa-se que todas as reações realizadas com o objetivo de promover o encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco resultaram em perfis monodispersos e estreitos muito semelhantes ao do homopolímero PMMA. Dessa forma, conclui-se que o fármaco não afetou a estabilidade da miniemulsão nem a manutenção da emulsão durante a polimerização. Esse resultado provavelmente indica que a atividade superficial do fármaco é desprezível.

Na Tabela V - 3 foram disponibilizados os valores de diâmetro médio de partícula e carga superficial obtidos ao final da reação, mantendo-se os valores do PMMA referência.

Tabela V - 3. Diâmetro médio de partículas e potencial zeta obtidos nos produtos resultantes do encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco.

	Diâmetro de Partículas (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
PMMA	76,64	0,229	-46,8
PMMA + 0,5%R	74,49	0,236	-45,8
P(MMA-co-AA) 10% +0,5%R	75,51	0,233	-39,4
P(MMA-co-AA) 12% +0,5%R	75,18	0,154	-40,9

Segundo a Tabela V - 3, as nanopartículas produzidas são caracterizadas por diâmetros similares e menores que 100 nm, característica também presente no PMMA puro. Os valores reduzidos de PDI (menores que 1,0) ainda reforçam o aspecto monodisperso e estreito das distribuições apresentadas na Figura V - 10 anterior. Com relação ao potencial zeta, novamente foram observados valores similares ao homopolímero padrão. Este fato apresenta importante impacto, pois alterações poderiam indicar que o fármaco estava posicionado na superfície da partícula, já que, o acúmulo de fármaco na superfície da nanopartícula poderia modificar a carga superficial.

O encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco, portanto, não apresentou efeitos significativos sobre o diâmetro e o potencial zeta das nanopartículas sintetizadas. Pode-se, então afirmar que o fármaco não afetou significativamente o processo de emulsificação e polimerização, garantindo a preservação das características do polímero produzido.

5.2.3. Massa Molar e Estrutura Química

A caracterização da estrutura química das nanopartículas encapsuladas permitiu avaliar preliminarmente se o fármaco estava encapsulado. A partir das análises de GPC, FTIR e RMN foi possível observar se houve alguma alteração estrutural na nanopartícula por conta da presença do fármaco.

A Tabela V - 4 apresenta os valores de massa molar ponderal média e o índice de polidispersão do homopolímero PMMA e das nanopartículas dopadas com o fármaco. Novamente, as nanopartículas obtidas apresentaram alta massa molar. Entretanto, ao analisar o índice de polidispersão e a distribuição de massas molares, ilustrada na Figura V - 11, foram encontrados efeitos interessantes após a adição do fármaco.

Tabela V - 4. Massas molares médias das nanopartículas de PMMA e das amostras contendo 0,5 %m/m de fármaco.

	Massa Molar (kDa)	PDI
PMMA	1534	2,403
PMMA + 0,5%R	1456	3,256
P(MMA-co-AA) 10% +0,5%R	2098	1,984
P(MMA-co-AA) 12% +0,5%R	1048	7,369

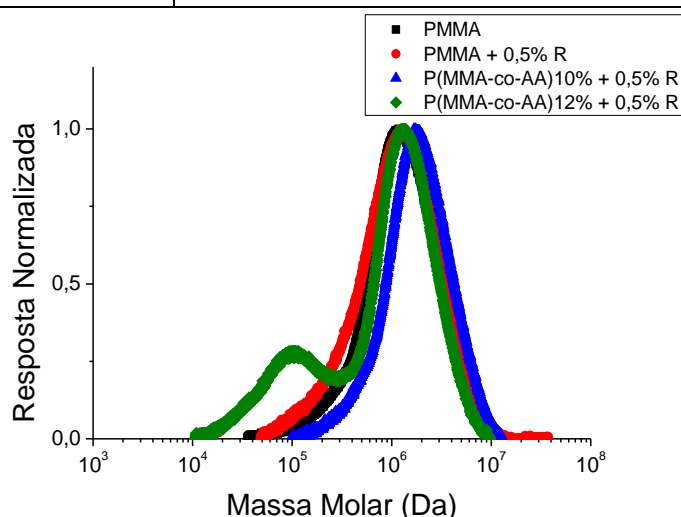


Figura V - 11. Distribuições de massas molares para PMMA e nanopartículas contendo 0,5 %m/m de fármaco.

Ao contrário do observado na Tabela V - 2 (Seção 5.1.3), as nanopartículas com maior teor de AA apresentaram menor massa molar (1048kDa contra os 2099kDa anteriores) e alto índice de polidispersão. Este último sugere tamanhos de cadeia diferentes, justificando o valor mais baixo de massa molar encontrado. Estas conclusões ainda são reafirmadas pela Figura V - 11, em que o copolímero produzido com 12 %m/m AA apresentou distribuição larga e bimodal, sugerindo a formação de uma cadeia polimérica de massa reduzida da ordem de 10^5 Da. Esse “ombro” sugere a formação de PAA na fase aquosa, que ficou retido no copolímero.

Já para o homopolímero e para o copolímero produzido com 10 %m/m AA, não foram observadas alterações significativas nos valores de massa molar, nas dispersões e nas distribuições de massas molares. Dessa forma, pode-se afirmar que não há evidências de interações significativas entre o fármaco e o meio reacional.

A modificação provocada pela adição do fármaco na estrutura do polímero final pode ser melhor avaliada com as análises de FTIR e RMN. Na Figura V - 12, encontram-se os espectros de FTIR obtidos para nanopartículas com encapsulamento de 0,5 %m/m de fármaco e sem adição de fármaco (Figura V – 12 A). Seguindo a mesma tendência das reações conduzidas sem adição de fármaco, foram observados picos em 2900 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} atribuídos, respectivamente, às ligações O-H, C-O-C e C=O de ácido carboxílico e éster presentes no homopolímero e copolímero e ausência de faixa larga de absorção na região $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ (CAMPOS-RAMOS, 2016; CÉSAR-OLIVEIRA *et al.*, 1999; RIBEIRO; SOUZA, 2007). Adicionalmente, não foram encontradas bandas em $1475\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ referentes às ligações duplas do anel aromático (RIBEIRO; SOUZA, 2007), presente no fármaco, sugerindo, que o mesmo se localizaria no interior da nanopartícula.

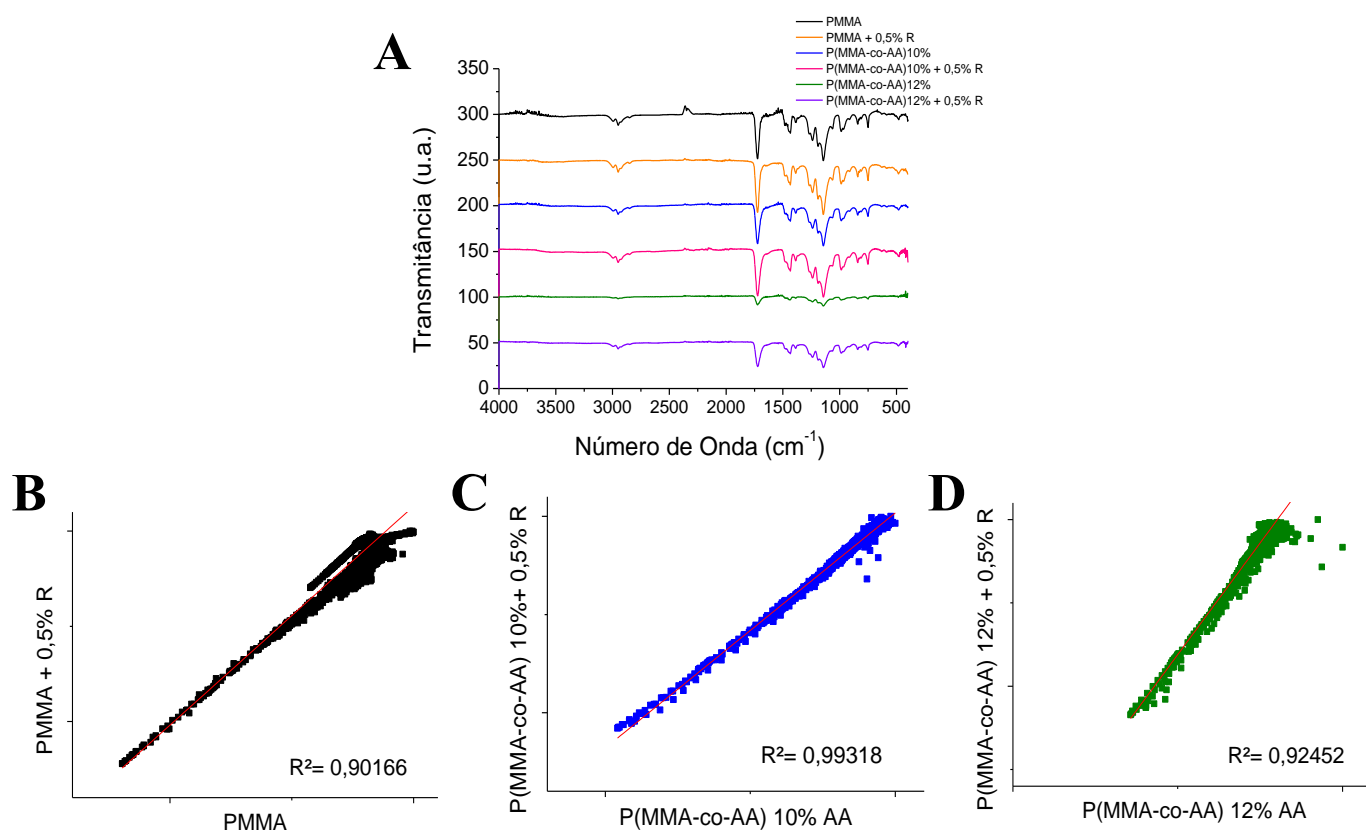


Figura V - 12. Espectros de FTIR obtidos para PMMA, copolímeros e nanopartículas produzidas com 0,5 %m/m R (A), comparação gráfica PMMA x PMMA +0,5%R (B), comparação gráfica P(MMA-co-AA)10% x P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R (C) e comparação gráfica P(MMA-co-AA)12% x P(MMA-co-AA)12% + 0,5% (D).

Para uma análise mais minuciosa dos espectros de FTIR, foram feitas comparações entre as intensidades de absorção das nanopartículas produzidas na ausência e presença do fármaco (Figura V – 12 B, 12 C e 12 D). Verificando os índices de correlação linear, pode-se observar alterações significativas nos espectros de FTIR ($R^2 \neq 1$) com exceção do caso P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R. Já para PMMA + 0,5%R e P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R, notaram-se pequenas mudanças nos espectros FTIR após a adição de rivastigmina.

Para a amostra P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R, as modificações observadas no FTIR podem estar associadas com a interação entre fármaco e comômero. Já a nanopartícula PMMA + 0,5%R exibiu maior grau de discrepância no FTIR, indicando possível interação do fármaco com o PMMA. Porém, como nenhuma alteração foi observada em outras análises, conclui-se que o fármaco pode interagir com o homopolímero, mas não o suficiente para alterar significativamente a sua estrutura ou a evolução da reação de polimerização.

A caracterização por RMN foi então realizada para as amostras de PMMA + 0,5%R e P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R, para confirmar o encapsulamento do fármaco e, no caso do copolímero, verificar o percentual de copolimerização. Na Figura V - 13, encontram-se os espectros RMN do PMMA e das nanopartículas produzidas na ausência e presença do fármaco.

Analisando-se os espectros de RMN obtidos, podem ser identificados novamente picos relacionados ao solvente clorofórmio ($\delta=7$ ppm) e a estrutura do PMMA, componente principal da cadeia polimérica ($\delta=3,6$ ppm do éster O-CH₃; $\delta=1,6-2,0$ ppm do grupo metileno e $\delta=0,8-1,0$ ppm do grupo metila). Da mesma maneira, também foi observado em $\delta=5,2-5,7$ ppm o sinal duplete correspondendo à ligação dupla CH₂ do monômero MMA, comprovando a presença do vestígios de monômero MMA na nanopartícula final.

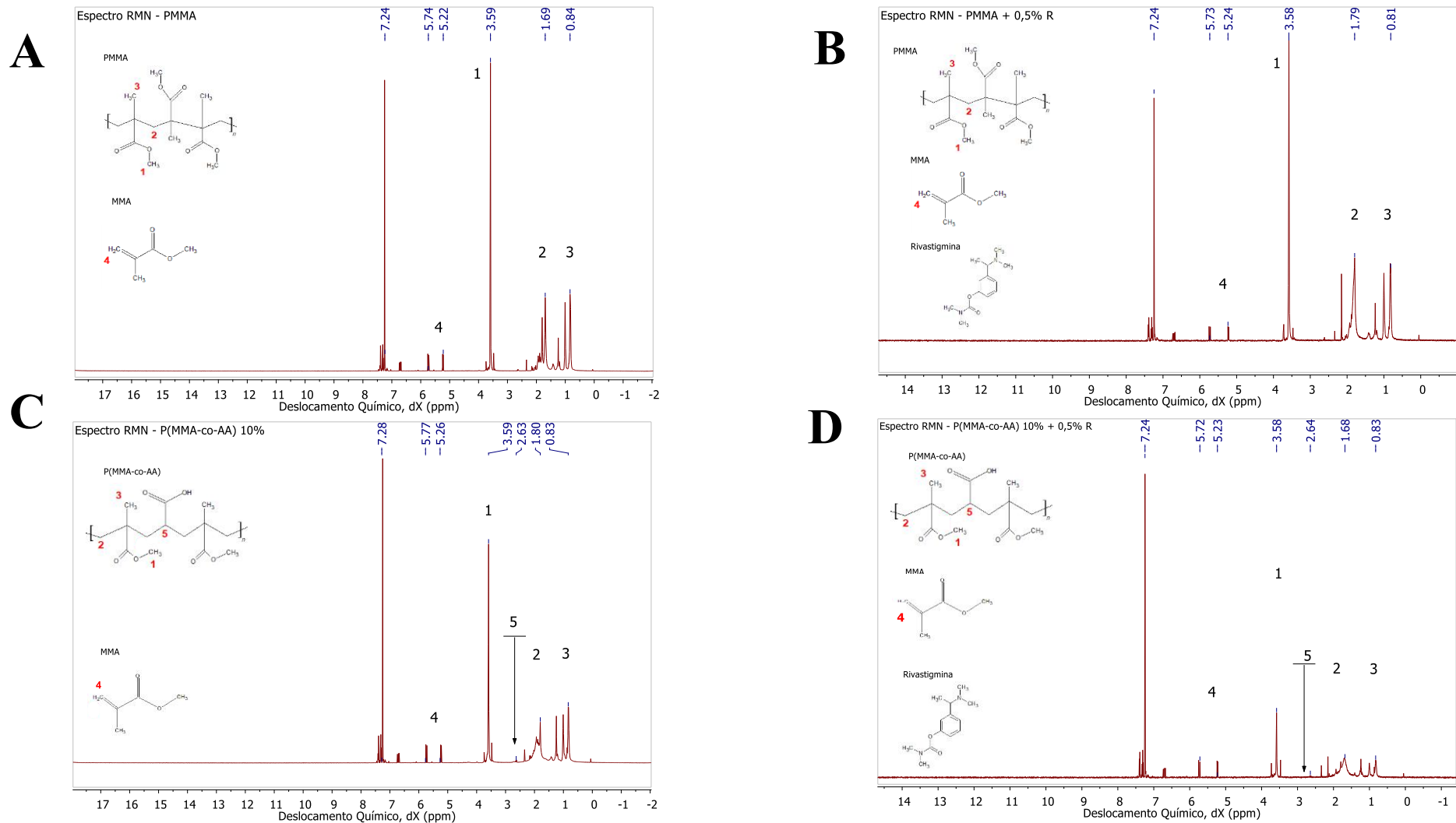


Figura V - 13. Espectro RMN obtido para PMMA (A), PMMA +0,5 %R (B), P(MMA-co-AA) 10% (C) e P(MMA-co-AA) 10% + 0,5%R (D).

Não foram observados picos relacionados à estrutura da rivastigmina, como picos posicionados em $\delta=6,5-8,0$ ppm associados ao anel aromático (RIBEIRO; SOUZA, 2007). Isto pode ser devido à baixa concentração do fármaco. Entretanto, foi possível observar a diminuição da intensidade dos picos, principalmente do copolímero dopado com fármaco. Este fato está associado à maior dificuldade de solubilização da amostra no solvente, resultando na análise de uma amostra mais diluída e com mais ruídos, o que pode ter ocorrido por conta da presença do fármaco.

Para o cálculo do percentual mássico de AA incorporado, foi adotado o mesmo procedimento já descrito na Seção 5.1.3. Para a amostra P(MMA-co-AA) 10% + 0,5%R foram calculados percentuais mássicos de incorporação de 2,9 %m/m de AA, contra 2,0 %m/m obtidos anteriormente. Dessa forma, a rivastigmina não reduziu a capacidade de copolimerização do sistema e de incorporação do AA.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o fármaco não reage quimicamente com o material polimérico.

5.2.4. Eficiência de Encapsulamento

Além de investigar o impacto do fármaco na preparação da nanopartícula, é importante quantificar a massa real de fármaco encapsulada. Dessa forma, o cálculo de eficiência do encapsulamento possibilitou averiguar a viabilidade de usar estas nanopartículas poliméricas como carreadores de rivastigmina base livre.

Primeiramente, foram realizadas varreduras em vários comprimentos de onda para determinação de um pico de resposta característico do fármaco no solvente utilizado. O comprimento de onda 263 nm foi selecionado por apresentar leituras de absorvância menores que 1,0. Os espectros de varredura e a curva padrão obtidos encontram-se no ANEXO A. Os resultados finais, percentuais e mássicos, obtidos para o encapsulamento de 0,5 %m/m de rivastigmina estão na Tabela V - 5.

Tabela V - 5. Eficiências de encapsulamento e massas de rivastigmina encapsuladas para PMMA +0,5%R, P(MMA-co-AA)10% +0,5%R e P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R.

	Eficiência de Encapsulamento (%) ± desvio padrão	Massa de Rivastigmina Encapsulada (mg)
PMMA + 0,5%R	81,96 ± 3,70	65,68
P(MMA-co-AA) 10% + 0,5%R	80,68 ± 2,68	64,54
P(MMA-co-AA) 12% + 0,5%R	73,20 ± 1,44	58,56

Com base na Tabela V - 5, observa-se que as eficiências de encapsulamento obtidas foram inferiores a 100%. A pequena perda de massa de rivastigmina pode ser explicada pela solubilização parcial na fase aquosa ou retenção física nas nanopartículas, como já relatado em estudos sobre o encapsulamento de TR em nanopartículas poliméricas (FAZIL *et al.*, 2012; JOSHI; CHAVHAN; SAWANT, 2010; KAUR *et al.*, 2011; PAGAR; VAVIA, 2013; VIJAYKUMAR; JOE; VISHWANATH, 2014; WILSON *et al.*, 2008). Como o teor de fármaco encapsulado é obtido por balanço de massa, a retenção do fármaco resulta em redução aparente de quantidade encapsulada.

Dentre as formulações utilizadas, notou-se que o PMMA + 0,5%R apresentou o maior valor percentual de encapsulamento. Entretanto, quando considerado o valor do desvio padrão, o resultado obtido foi muito semelhante ao obtido pelo copolímero P(MMA-co-AA)10% + 0,5%R. Outro ponto observado foi a redução do percentual de eficiência com o aumento da proporção de AA. Uma possível explicação pode estar relacionado à solubilidade do AA em MMA. Sendo o AA mais polar, este apresenta maior tendência em se deslocar para a fase aquosa e polimerizar formando PAA. Com a adição de RBL na fase orgânica, a solubilidade do AA em MMA pode ter sido reduzida, resultando na formação de cadeias de PAA de tamanhos diferenciados. A menor incorporação do fármaco pode indicar a maior retenção de rivastigmina com o aumento de teor de AA.

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o copolímero P(MMA-co-AA) apresenta potencialidade para uso no encapsulamento de RBL. Em particular, o fármaco afeta pouco a evolução da reação e as qualidades do produto final, permitindo eficiência de encapsulamento superior a 70%.

5.3. Funcionalização com Lisina e TAT

De acordo com os dados apresentados, a bioconjugação apresenta-se como uma estratégia promissora para a entrega sítio-dirigida de ativos, principalmente por meio de adsorção química. Nesta etapa do estudo, nanopartículas copoliméricas preparadas com 10 %m/m e 12 %m/m AA na presença e ausência do fármaco foram funcionalizadas com lisina, utilizada como molécula modelo de estudo. Isto viabilizou a avaliação da influência do fármaco no processo de funcionalização. Posteriormente, P(MMA-co-AA)12% e P(MMA-co-AA)12% + 0,5%R foram selecionados para bioconjugação com o peptídeo TAT. Dessa forma, verificaram-se modificações de comportamento dos materiais produzidos com o peptídeo e o aminoácido. Todas as nanopartículas funcionalizadas foram caracterizadas em termos de eficiência de conjugação e por FTIR, para confirmação da formação de ligação química entre o bioconjugado e o polímero.

5.3.1. Estrutura Química de Nanopartículas Funcionalizadas

A presença de picos de absorção em regiões $3100-3300\text{ cm}^{-1}$ e $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ são característicos de grupamentos amina, presentes em ambas as biomoléculas escolhidas neste estudo (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016; RIBEIRO; SOUZA, 2007). Dessa forma, espera-se a presença destes picos, quando a ligação covalente entre a nanopartícula e a biomolécula for efetivada. Na Figura V - 14 encontram-se os espectros de FTIR das nanopartículas não funcionalizadas e funcionalizadas com lisina para fins de comparação.

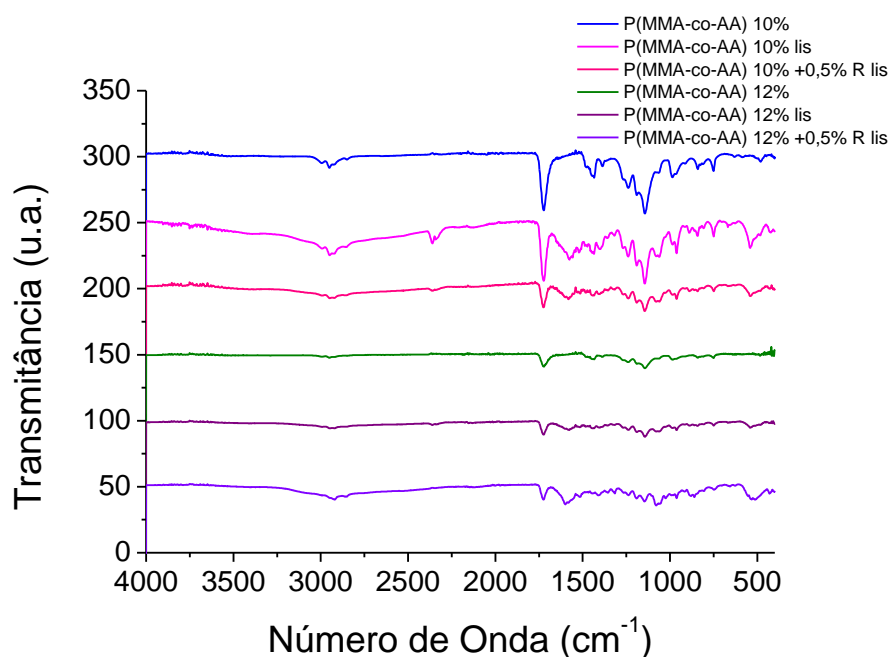


Figura V - 14. Espectros de FTIR obtidos para nanopartículas produzidas com 10 %m/m e 12 %m/m de AA na presença e ausência de 0,5 %m/m de fármaco e funcionalizadas com lisina.

A Figura V - 14 compara as nanopartículas que passaram pelo processo de bioconjugação química e as nanopartículas não funcionalizadas. Notou-se que os picos de adsorção característicos do copolímero ainda estão presentes em todas as amostras. As amostras funcionalizadas produzidas com 12 %m/m de AA apresentaram intensidades reduzidas, fato também associado à quantidade de amostra analisada.

Comparando os espectros obtidos, observou-se um pico de absorção na região 1640 cm^{-1} apenas para as nanopartículas funcionalizadas, independentemente da presença do fármaco. Isto também foi observado por CAMPOS, FERRAZ e PINTO (2016), que destacaram que este resultado indicaria adsorção química e não física, de lisina por representar a formação do grupamento amida (CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016). Portanto, foi possível funcionalizar os copolímeros com 10 %m/m e 12 %m/m de AA com lisina, independentemente da presença do fármaco encapsulado.

Para imobilização de TAT, foi utilizada a mesma metodologia de funcionalização empregada para lisina. Entretanto, como a massa molar do peptídeo é muito superior ao da lisina ($1559,83\text{g/mol}$ contra $146,19\text{g/mol}$), optou-se por reduzir a carga mássica no sistema, para evitar impedimento estérico. Além disso, apenas as nanopartículas produzidas com 12 %m/m AA foram selecionadas, a fim de investigar somente o efeito da presença de rivastigmina no processo de funcionalização do peptídeo. Novamente, para confirmação de reação química foi escolhida a técnica de FTIR (Figura V – 15).

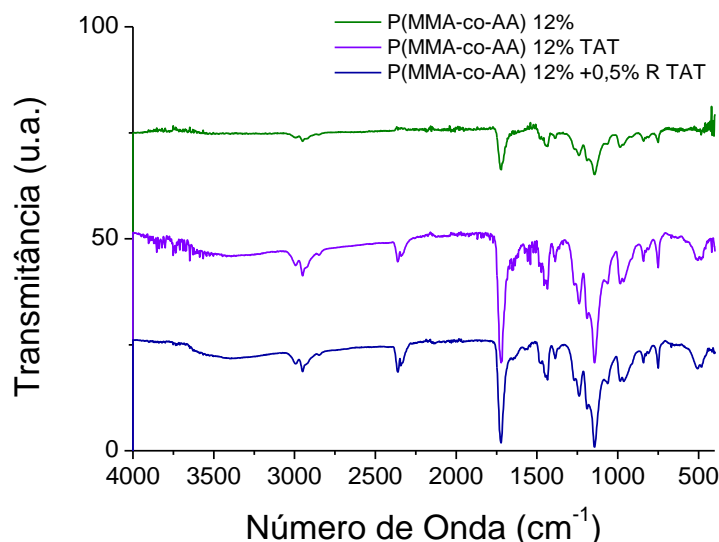


Figura V - 15. Espectros de FTIR obtidos para nanopartículas produzidas com 12 %m/m de AA na presença e ausência de 0,5 %m/m de fármaco e funcionalizadas com TAT.

Analogamente ao observado na Figura V - 14, nota-se um reduzido pico na região de 1640 cm^{-1} apenas para as nanopartículas funcionalizadas. A baixa intensidade do pico sugere uma reduzida eficiência de funcionalização quando comparada à lisina, provavelmente pela menor massa de peptídeo empregada. Entretanto, confirma-se que independentemente da presença do fármaco, a funcionalização de TAT foi bem sucedida.

5.3.2. Eficiência de Funcionalização

A quantificação do percentual de funcionalização permitiu avaliar a eficácia do processo de bioconjugação das nanopartículas obtidas. As curvas padrão de BSA e lisina encontram-se no ANEXO B.

Para a funcionalização de nanopartículas com lisina e TAT, os resultados percentuais obtidos estão apresentados na Tabela V - 6.

Tabela V - 6. Eficiências de funcionalização de lisina e TAT em copolímeros preparados com 10 %m/m e 12 %m/m de AA na presença ou ausência de 0,5 %m/m de rivastigmina.

	Eficiência de Funcionalização de Lisina (%)	Eficiência de Funcionalização de TAT (%)
P(MMA-co-AA) 10%	71,49	-
P(MMA-co-AA) 10% + 0,5%R	76,14	-
P(MMA-co-AA) 12%	76,51	94,15
P(MMA-co-AA) 12% + 0,5%R	79,05	94,19

De acordo com a Tabela V - 6, todas as amostras foram capazes de reagir com o aminoácido com alta eficiência. Não foram observadas alterações significativas entre as nanopartículas encapsuladas e não encapsuladas, sugerindo que o fármaco não afeta o processo de bioconjugação. Adicionalmente, os valores similares de eficiência obtidos para copolímeros preparados com 10 %m/m e 12 %m/m de AA indicaram que a variação do teor de ácido acrílico não produziu alterações significativas de capacidade de bioconjugação de moléculas. Como explicado anteriormente, o processo de bioconjugação não requer a presença de grupos funcionais em elevada concentração na superfície das partículas.

O fato do processo não ser 100% efetivo pode ser explicado pela alta massa de lisina utilizada (40 mg). Como se trata de um aminoácido, não era esperado impedimento estérico ou dificuldade com transferência de massa no processo. Dessa forma, sugere-se que há um excesso de massa de lisina não reagido por saturação do suporte.

Os resultados para bioconjugação com TAT destacaram a alta capacidade de funcionalização das nanopartículas com o peptídeo de interesse. Novamente, não foram observadas variações significativas da eficiência de funcionalização após adição do fármaco.

Dessa forma, concluiu-se que o fármaco não afeta a etapa de funcionalização, o que já era esperado, tendo em vista resultados anteriores que indicaram a presença da rivastigmina no interior da nanopartícula. Adicionalmente, ressaltou-se o alto valor de eficiência obtido, provavelmente pela baixa massa inicial de peptídeo.

5.4. Aumento de Percentual Mássico de Fármaco

As seções anteriores mostraram a viabilidade de usar copolímeros P(MMA-co-AA) para encapsulamento de 0,5 %m/m de rivastigmina. Os resultados comprovaram por meio da caracterização do látex produzido, a copolimerização bem sucedida em tamanho nanométrico e com altos percentuais de encapsulamento de fármaco. Em busca de uma formulação com maior carga de RBL, foram estudadas novas reações de polimerização *in situ*, variando a composição mássica do fármaco em 1 %m/m, 1,5 %m/m e 2 %m/m. Para caracterização foram utilizados os perfis de conversão, os diâmetros de partícula, o potencial zeta e a eficiência de encapsulamento.

5.4.1. Conversão

A análise de conversão com o aumento de fármaco foi realizada para verificar a hipótese de interferência da rivastigmina no andamento da reação. Algumas reações apresentaram formação de aglomerados poliméricos nos instantes iniciais (menos de 20 minutos) semelhantes aos observados no caso P(MMA-co-AA) 15%. A presença de tais estruturas indicaria menor homogeneidade dos diâmetros de partículas e perda de estabilidade de emulsão, inviabilizando o uso para a aplicação desejada.

Este fenômeno, ilustrado na Figura V - 16, foi observado para as reações P(MMA-co-AA) 12% +1%R, P(MMA-co-AA) 10% + 1,5%R e P(MMA-co-AA) 7,5% + 2%R. Como estes agregados poliméricos não foram observados em quaisquer reações de encapsulamento com PMMA, este comportamento parece estar associado somente à interação entre rivastigmina-ácido acrílico. Dessa forma, estes resultados confirmaram a existência de uma relação inversa entre os percentuais de AA e de fármaco encapsulado. Em outras palavras, quanto maior é o teor inicial de AA, menor é o teor máximo de

rivastigmina possível na formulação. Aparentemente, é a primeira vez que esse efeito é relatado na literatura e pode indicar o deslocamento de AA para a superfície de partícula induzido pela presença do fármaco.



Figura V - 16. Agregados poliméricos observados na reação P(MMA-co-AA)10% +1,5%R. Isto também foi observado nas reações P(MMA-co-AA)12% +0,5%R e P(MMA-co-AA) 7,5% +2%R.

Dessa forma, os perfis de conversão (Figura V - 17) só foram obtidos para as formulações estáveis testadas: PMMA + 1%R, P(MMA-co-AA)10% + 1%R, PMMA +1,5%R e P(MMA-co-AA)7,5% + 1,5%R. Com base nesses perfis, a Figura V - 17 permite concluir que nas reações em que não foram observados agregados poliméricos, foram obtidos os mesmos perfis de conversão obtidos para o PMMA puro.

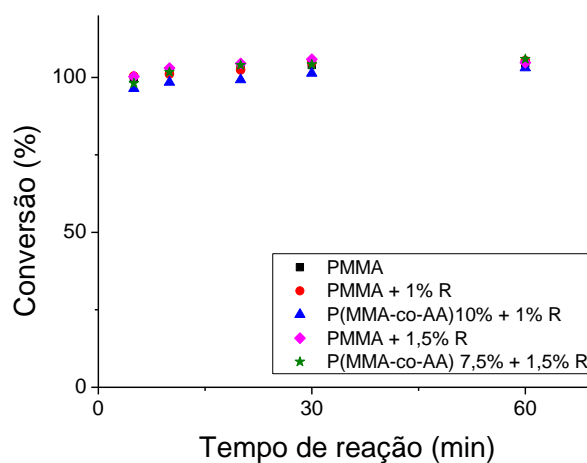


Figura V - 17. Perfis de conversão das reações de polimerização em miniemulsão conduzidas com 1 %m/m e 1,5 %m/m de rivastigmina.

Para as reações conduzidas com o aumento de fármaco, confirmou-se a suspeita da existência de interação entre rivastigmina e o comonômero, inviabilizando o uso de mais de 1,5 %m/m de fármaco na reação. A conversão final obtida foi de 100% e cinética similar à da reação de MMA puro.

5.4.2. Diâmetro de Partícula e Potencial Zeta

O resultado anterior indicou que a inserção de 1 %m/m e 1,5 %m/m de fármaco não resultou em alterações significativas da conversão. Entretanto, foram observadas instabilidades de emulsão para algumas composições testadas. Coube, portanto, analisar se os látices estáveis apresentaram variações no diâmetro médio de partícula e potencial zeta em relação ao caso do homopolímero. A Tabela V - 7 apresenta os resultados obtidos para estas caracterizações em sistemas em que foram usadas maiores quantidades de fármaco.

Tabela V - 7. Diâmetros médios de partículas e potencial zeta obtidos após encapsulamento de 1 %m/m e 1,5 %m/m de fármaco.

	Diâmetro de Partículas (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
PMMA	76,64	0,229	-46,8
PMMA + 1%R	81,26	0,217	-52,4
P(MMA-co-AA) 10% + 1%R	80,76	0,239	-40,3
PMMA + 1,5%R	58,29	0,080	-44,3
P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R	69,82	0,129	-42,9

A Figura V - 18 apresenta as curvas de distribuição de tamanhos obtidas para as formulações estáveis contendo 1 %m/m e 1,5 %m/m de rivastigmina. Conforme observado para as reações anteriores (para obtenção de copolímeros e encapsulamento de 0,5 %m/m), também foram obtidas distribuições de tamanho estreitas em diâmetros menores que 100 nm. Isto está em conformidade com o valor de PDI observado (Tabela V - 8) e com a evolução da cinética de copolimerização já discutida previamente. Conclui-se que, para os látices mais estáveis, as concentrações mais elevadas de fármaco não induziram maior diâmetro de partícula.

No entanto, parece que a adição de 1,5 %m/m de fármaco resulta na produção de partículas menores e distribuições mais estreitas, evidenciando o efeito sobre a estabilidade do meio disperso. A produção de partículas menores pode sugerir que um dos mecanismos responsáveis pela perda de estabilidade de emulsão seria o aumento de área específica das partículas do látex.

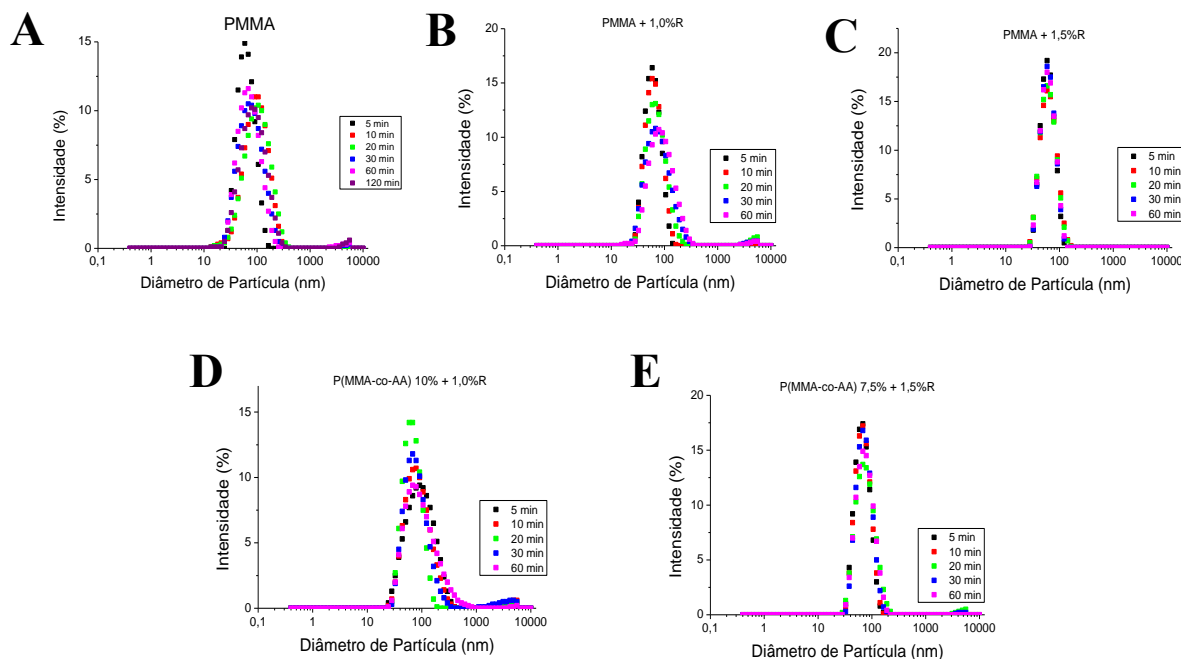


Figura V - 18. Distribuições de diâmetros de partícula para reações produzidas com 1 %m/m e 1,5 %m/m de rivastigmina

O potencial zeta não apresentou modificações significativas com a maior adição de fármaco de forma que o surfactante ainda apresenta papel fundamental para a carga interfacial da nanopartícula, e não o fármaco. Isto corrobora para a conclusão anterior de que o fármaco deve estar encapsulado e não concentrado na superfície do nanomaterial mesmo em concentrações mássicas superiores.

A utilização de maior teor de fármaco na produção de látices estáveis não resultou, portanto, em modificações significativas dos diâmetros médios de partícula final e do potencial zeta. Este fato permitiu concluir que, para as formulações obtidas, o fármaco não parece ter alterado a cinética de polimerização nem se acumulou superficialmente na nanopartícula, estando portanto encapsulado.

5.4.3. Eficiência de Encapsulamento

O objetivo principal destas últimas reações foi obter nanopartículas com maiores teores de fármaco encapsulados, o qual foi calculado a partir da curva padrão do ANEXO A. Na Tabela V - 15 estão dispostos os resultados obtidos e relacionados ao encapsulamento do fármaco, para melhor comparação dos testes realizados.

Tabela V - 8. Eficiências de encapsulamento e massas de rivastigmina encapsuladas nas reações de encapsulamento.

	Eficiência de Encapsulamento (%)	Massa de Rivastigmina Encapsulada (mg)
	± desvio padrão	
PMMA + 0,5%R	82,10 ± 3,70	65,68
P(MMA-co-AA) 10% + 0,5%R	80,68 ± 2,68	64,54
P(MMA-co-AA) 12% + 0,5%R	73,20 ± 1,44	58,56
PMMA + 1%R	91,54 ± 2,37	146,46
P(MMA-co-AA) 10% + 1%R	88,92 ± 1,18	142,27
PMMA + 1,5%R	95,78 ± 2,04	229,87
P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R	85,68 ± 1,13	205,63

Com base na Tabela V - 8, observou-se que o aumento de rivastigmina no meio orgânico gerou maiores eficiências de encapsulamento, seja no homopolímero ou nos copolímeros testados. Este resultado já era esperado, pois a inserção de maior massa de fármaco aumenta a sua concentração na fase orgânica e minimiza perdas relativas. Isto parece indicar que a retenção de fármaco nas partículas é responsável pelos teores inferiores a 100% calculados.

Comparando o comportamento do homopolímero com o do copolímero, nota-se que o encapsulamento em PMMA resulta em eficiências ligeiramente superiores. Entretanto, quando foi levada em conta a margem de erro com 95% de confiança,

confirmou-se que a diferença não é significativa (Figura V - 19). É provável que a adição de AA ao copolímero aumente a retenção do fármaco no material produzido.

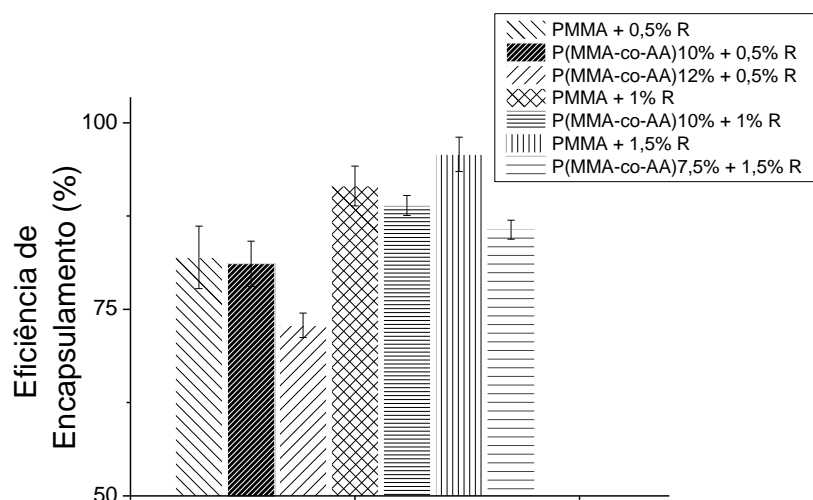


Figura V - 19. Eficiências de encapsulamento para todas as nanopartículas produzidas na presença de fármaco.

Adicionalmente, em comparação com a literatura, pode-se dizer que as nanopartículas dopadas com 1 %m/m e 1,5 %m/m de rivastigmina apresentaram resultados de encapsulamento muito superiores. A literatura apresentou altos valores de eficiência de encapsulamento (de 60 até 95% - Tabela III -3), entretanto, foram utilizadas baixas massas de ativo. Neste estudo, portanto, foi possível obter maior encapsulamento mássico de fármaco devido à escolha de uma metodologia de produção das nanopartículas em acordo com a natureza hidrofóbica do fármaco.

Por fim, apesar da eficiência de encapsulamento ser aproximadamente a mesma, observa-se que a massa de rivastigmina encapsulada foi cerca de 3 vezes maior quando utilizados os percentuais 1,5%. Assim, esta composição apresentou-se mais promissora como estratégia carreadora do fármaco por maximizar a concentração de rivastigmina encapsulada.

5.5. Funcionalização de Copolímeros com Lisina

Na Seção 5.3 foi comprovado por meio de análise estrutural que o protocolo adotado para imobilização de biomoléculas foi eficiente para promover a reação química entre copolímeros preparados com 10 %m/m e 12 %m/m de AA e as biomoléculas. Além disso, foi observado que o teor de ácido acrílico que permitiu maior encapsulamento mássico de rivastigmina foi o de 7,5 %m/m AA. Assim, o presente teste objetivou avaliar se a porcentagem de ácido acrílico estudada (7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m) apresenta alguma influência na eficiência de funcionalização.

5.5.1. Eficiência de Funcionalização

Neste procedimento, apenas a bioconjugação com lisina foi realizada, já que esta foi usada como molécula modelo anteriormente. Uma nova curva padrão de lisina foi calculada (ANEXO C), pois foi utilizado um novo reagente para realizar este ensaio. Os resultados para eficiência de funcionalização com lisina estão na Tabela V - 9.

Tabela V - 9. Eficiências de funcionalização de lisina em PMMA e copolímeros preparados com 7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m de ácido acrílico.

Eficiência de Funcionalização de Lisina (%)	
	± desvio padrão
PMMA	18,20 ± 10,66
P(MMA-co-AA) 7,5%	52,95 ± 10,65
P(MMA-co-AA) 10%	47,13 ± 8,60
P(MMA-co-AA) 12%	48,35 ± 2,70

Analisando a Tabela V - 9, nota-se que os valores percentuais obtidos para os copolímeros foram substancialmente superiores aos encontrados para o homopolímero. O baixo valor obtido para funcionalização de PMMA está associado à existência apenas de adsorção física da lisina já que o mesmo não apresenta radicais ácidos para reação química. A adsorção física de biomolécula utilizando a metodologia de ativação por EDC adotada neste teste também foi reportada na literatura (CAMPOS; FERRAZ; PINTO,

2016). Assim, torna-se evidente o benefício do uso de comonômeros com grupos terminais ácidos para aumento de eficiência de adsorção química de biomoléculas.

Adicionalmente, foi observado que as eficiências alcançadas neste teste foram inferiores às calculadas anteriormente. Nos testes da Seção 5.3, as eficiências de imobilização obtidas foram da ordem de 75%. Aqui, foram atingidos percentuais mais reduzidos, o que pode estar associado ao uso de um reagente distinto e mais sensível à quantificação de lisina.

Para confiança estatística, o teste foi realizado em triplicatas para cálculo de margem de erro com 95% de confiança. Na Figura V - 20 encontra-se um gráfico de colunas associadas às barras de erro respectivas. Como pode ser observado, não foram encontradas diferenças significativas entre os processos de bioconjugação conduzidos com os teores de ácido acrílicos utilizados. Além disso, com o auxílio das barras de erro calculadas, pode-se perceber que não houve uma grande discrepância dos valores anteriores em relação aos valores anteriores (aproximadamente 75%).

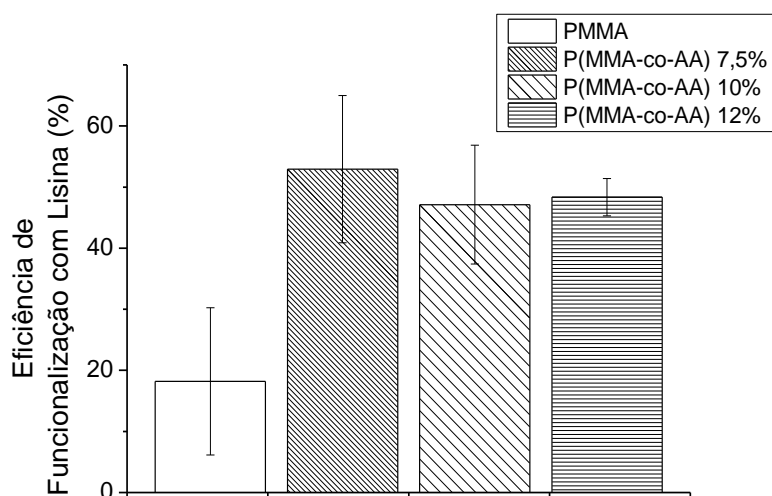


Figura V - 20. Eficiências de funcionalização de lisina para PMMA e copolímeros produzidos com 7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m de ácido acrílico.

Pode-se concluir que a inserção do comonômero apresenta papel fundamental no aumento da eficiência de imobilização de biomoléculas nas nanopartículas sintetizadas. Além disso, todos os teores de ácido acrílico utilizados foram considerados estatisticamente semelhantes. Isto permitiu identificar a amostra P(MMA-co-AA) 7,5% +1,5%R como a mais apropriada, tendo em vista o potencial para funcionalização, associado a maior quantidade de fármaco encapsulado.

5.6. Ensaio de Liberação

Este ensaio permite estudar como é o mecanismo de liberação do fármaco do interior da nanopartícula para o meio externo. Assim, a partir do entendimento da cinética de liberação, os valores obtidos podem ser transportados para modelos teóricos, a fim de obter melhor esclarecimento acerca dos fenômenos envolvidos no processo.

Conforme mencionado anteriormente, o ensaio foi realizado em triplicatas experimental. De acordo com a Figura V - 21, em um período de 24h não foi detectada a presença de rivastigmina, indicado pela ausência de leitura em 2,1 min. Isto sinaliza que o fármaco está fortemente aprisionado no interior das nanopartículas.

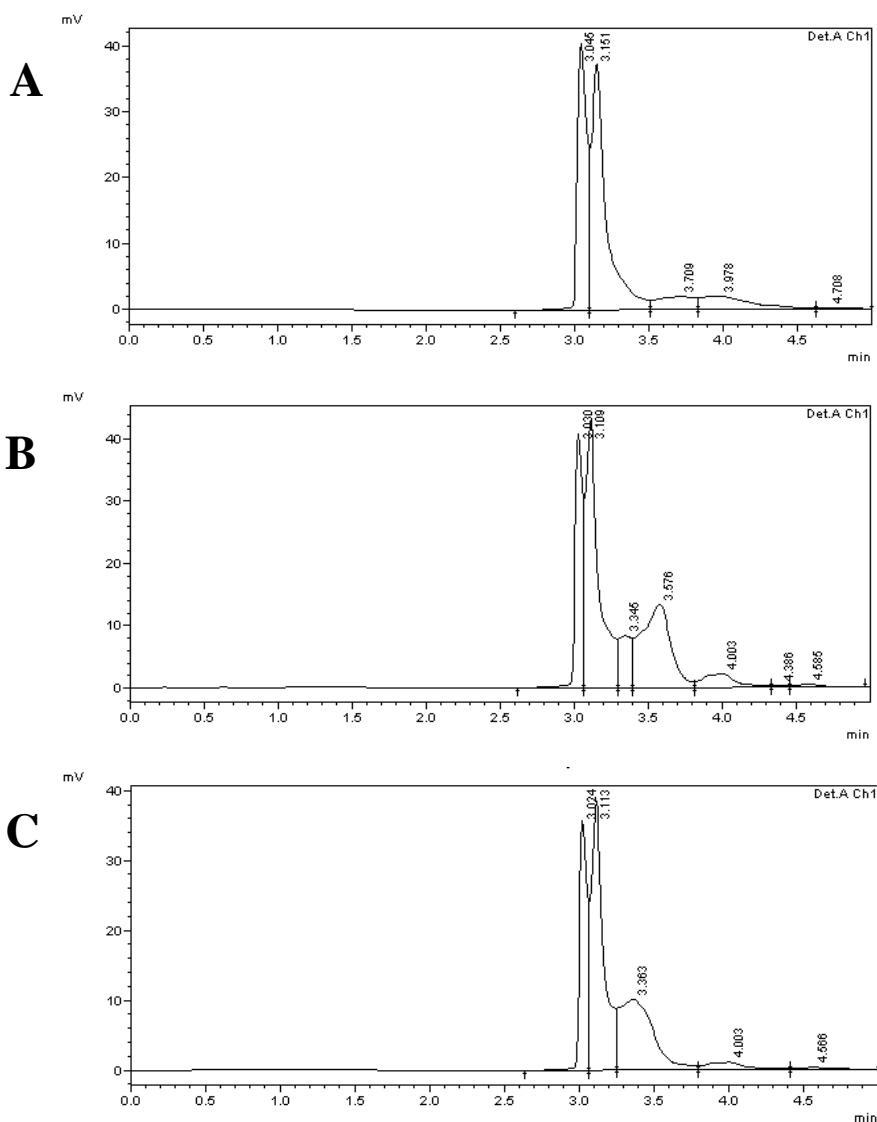


Figura V - 21. Cromatogramas obtidos durante o teste de liberação após 0 min (A), 5 min (B) e 24 horas (C) do início do experimento.

Cabe ressaltar que os cromatogramas gerados durante o teste de liberação foram distintos aos obtidos para rivastigmina pura diluída em água (ANEXO D). Isto pode ser explicado por conta da interferência de leitura do meio de liberação puro, ilustrado na Figura V – 21A. Como este resultado também foi obtido pelas outras replicatas experimentais, não foi possível, portanto, determinar o mecanismo de liberação do ativo encapsulado.

O fato de CRAPARO *et al.* (2008) ter conseguido liberar RBL em meio tampão PBS em 24h está associado ao método de encapsulamento utilizado. No presente estudo, o encapsulamento foi realizado *in situ* durante a reação de polimerização. Isto permitiu não só alta eficiência de encapsulamento, como também a formação de uma matriz polimérica vítrea (PMMA) ao redor do fármaco. CRAPARO *et al.* (2008), por outro lado, banharam nanopartículas pré-formadas em solução de fármaco, garantindo apenas adsorção superficial do ativo. Mesmo assim, a porcentagem liberada foi baixa (30%) devido à reduzida solubilidade do fármaco em PBS puro (CRAPARO *et al.*, 2008).

Segundo ABOUELMAGD *et al.* (2015) a solubilidade do fármaco no meio reacional apresenta tamanha importância que a sua negligência pode resultar em subestimação da liberação ou conclusão indevida do resultado obtido (ABOUELMAGD *et al.*, 2015). Dessa forma, algumas estratégias podem ser adotadas em experimentos futuros como a otimização de meio de liberação (a partir de testes de solubilidade prévios), aumento de tempo de estudo e diminuição de concentração de nanopartícula (para aplicar o conceito de solução diluída). Cabe ressaltar que o fármaco não está preso à estrutura polimérica, como indicaram os testes anteriores de eficiência de encapsulamento. Portanto, é preciso projetar o sistema de liberação para remoção das resistências eventualmente existentes para a transferência de massa.

5.7. Estudos in vitro

Os testes conduzidos em célula Caco-2 visaram avaliar a resposta celular após contato direto com nanopartículas. Primeiramente, foi necessário calcular o limite de toxicidade associado a 50% de morte celular (CC50). Posteriormente, foi avaliada a influência da funcionalização da nanopartícula com peptídeo TAT para passagem através da membrana plasmática celular utilizando o sistema *Transwell*[®].

5.7.1. Citotoxicidade das Nanopartículas

A escolha das amostras objetivou avaliar a influência do comonômero e a presença do fármaco na tolerabilidade do nanomaterial. Os resultados para os valores CC50 calculados estão dispostos na Tabela V - 10.

Tabela V - 10. Valores CC50 obtidos para as nanopartículas testadas em células Caco-2.

Fármaco	CC50 ($\mu\text{g/mL}$ rivastigmina)	CC50 ($\mu\text{g/mL}$ nanopartículas)
	\pm desvio padrão	\pm desvio padrão
Fármaco	Acima de 250	-
PMMA*	52,31 \pm 7,46	1569,80 \pm 268,48
PMMA + 1,5%R	52,86 \pm 9,28	1555,17 \pm 334,11
P(MMA-co-AA) 7,5% *	34,52 \pm 10,80	834,19 \pm 432,13
P(MMA-co-AA) 7,5% +1,5%R	51,26 \pm 16,76	1601,62 \pm 670,26

*em amostras sem fármaco encapsulado foi usado o mesmo volume de látex para a sua formulação com adição de fármaco no meio.

Analisando-se a Tabela V - 10, notou-se que o fármaco não apresenta citotoxicidade na faixa de concentração utilizada, corroborando com dados de literatura. GOLDBLUM *et al.* (2002) obtiveram sinais de toxicidade aguda em células epiteliais somente em 50

mg/mL de rivastigmina, valor muito superior ao utilizado neste ensaio (GOLDBLUM *et al.*, 2002). Adicionalmente, SCIALABBA *et al.* (2012) utilizaram a concentração máxima de 0,2 mg/mL de rivastigmina livre como controle em testes citotóxicos em neuroblastomas e também não observaram perda de viabilidade celular (SCIALABBA *et al.*, 2012). Garantiu-se, portanto, que a resposta citotóxica lida foi relativa apenas à influência da exposição aos látex diluído em meio de cultura, ou seja, às nanopartículas e ao seu meio dispersivo contendo bicarbonato de sódio, estabilizador e SDS.

A triplicata experimental realizada garantiu reprodutibilidade satisfatória, tendo em vista os valores de desvio padrão menores que 20%. Além disso, foi observado que não houve alteração significativa entre a resposta citotóxica do homopolímero e do copolímero. Isto sugere que a toxicidade não foi causada pela copolimerização (comonômero) ou pelo encapsulamento do fármaco. Este resultado já era previsto, considerando-se que o comonômero escolhido é biocompatível e que o fármaco, mesmo se fosse tóxico, estaria encapsulado no interior da partícula, sem contato direto com a célula.

A fim de avaliar se há divergência significativa entre os látices, um gráfico de colunas com barras de erro indicando intervalo de confiança de 95% foi construído (Figura V - 22).

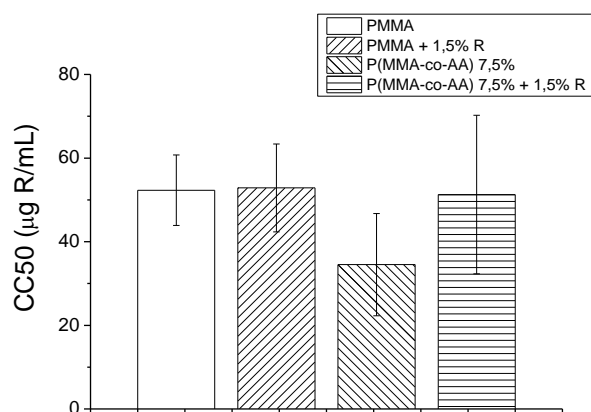


Figura V - 22. Valores de CC50 encontrados para os látices testados com margem de erro para 95% de confiança.

Analisando a Figura V - 22, concluiu-se que os comportamentos citotóxicos observados pelos látices puderam ser considerado estatisticamente semelhantes e aproximadamente iguais a 50 µg/mL de rivastigmina. Isto sugere que a citotoxicidade pode estar associada a outros elementos presentes na amostra, como o estabilizador ou o

surfactante presentes tanto na reação quanto na formulação final do látex.

Convertendo-se os valores encontrados em termos de nanopartícula, a CC50 média obtida foi de aproximadamente 1400 µg/mL de nanopartícula. Este resultado pode ser confirmado a partir da comparação com outros ensaios citotóxicos da literatura. Craparo *et al.* (2008) realizaram testes de citotoxicidade por 48 h de suspensões de nanopartículas de PHM até 1 mg/mL em células de leucemia mielóide humana (K-562) e não obtiveram perda de viabilidade celular (CRAPARO *et al.*, 2008). FEUSER *et al.* (2014) testaram nanopartículas de PMMA a 1000 ng/mL por 24h em células leucêmicas humanas (THP1) e de adenocarcinoma pulmonar (A549) e não detectaram alterações citotóxicas (FEUSER *et al.*, 2014). Como em ambos os casos foram utilizadas concentrações inferiores, pode-se esperar que a CC50 das amostras sintetizadas seriam superiores a 1 mg/mL, como aqui observado.

De acordo com a bula do medicamento atualmente disponível no mercado (EXELON: rivastigmina, 2013), a biodistribuição da rivastigmina no sangue e plasma humanos está compreendida entre 1 e 400 ng/mL (NOVARTIS BIOCIEÊNCIAS, 2016). Adicionalmente, estudos farmacocinéticos de absorção do medicamento indicam concentrações plasmáticas máximas de 20 ng/mL em intervalos inferiores a 24h (NOVARTIS BIOCIEÊNCIAS, 2011). Isto permite inferir que a CC50 encontrada apresenta valores muito superiores aos possivelmente utilizados em testes clínicos reais. Assim, as concentrações de nanopartículas necessárias não atingiriam este nível de toxicidade.

Os estudo de citotoxicidade em Caco-2 permitiu concluir que os valores de CC50 obtidos foram estatisticamente semelhantes entre todas as amostras utilizadas. A razão da redução da viabilidade, portanto, deve estar associada a algum outro elemento da reação de polimerização que não o comonômero ou o fármaco. Outro possível motivo seria a presença de material nanoparticulado, o qual apresenta propriedades diferenciadas daquelas de escala atômica ou macro. O teste permitiu concluir que os valores obtidos são muito superiores a solubilidade e concentração plasmática do fármaco em casos clínicos. Dessa forma, a aplicação desta concentração de látex nunca seria utilizada em organismos biológicos, garantindo a segurança do indivíduo.

5.7.2. Ensaio Transwell

O resultado anterior permitiu estabelecer um limite superior de concentração a ser usada para garantir a viabilidade de células durante o ensaio *Transwell*. O ensaio objetivou verificar se há passagem de nanopartículas através da membrana citoplasmática de células Caco-2 viáveis e confluentes, assemelhando-se às condições *in vivo*.

Para identificação da passagem todas as nanopartículas foram marcadas com fluoróforo ABZ, sendo que as partículas imobilizadas com peptídeo TAT apresentaram eficiência de 70% no processo de conjugação. Para fins comparativos, o ensaio utilizou controle celular (branco de leitura), controle de membrana e controle positivo. O controle de membrana foi caracterizado pelo uso de P(MMA-co-AA)7,5% +1,5%R no compartimento apical do *Transwell* sem cultura celular, ou seja, a passagem é livre para o compartimento basal. Assim, foi possível identificar se a membrana do suporte poderia influenciar na passagem de nanopartículas. Já o uso do agente quelante, EDTA, para o controle positivo permitiu desfazer junções celulares e permitir o transporte máximo possível pela barreira celular. A Figura V - 23 apresenta a micrografia das barreiras celulares após o ensaio.

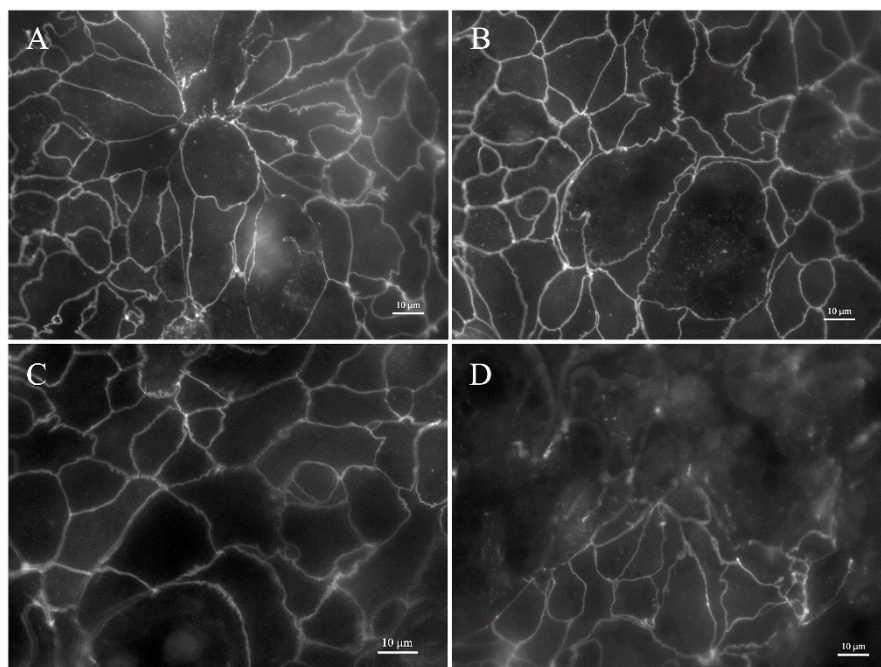


Figura V - 23. Micrografias obtidas após realização do teste *Transwell* para controle celular (A), teste com P(MMA-co-AA) 7,5% (B), P(MMA-co-AA) 7,5% +1,5%R (C) e controle positivo (D).

De acordo com as micrografias da Figura V - 23, observou-se a manutenção da confluência no decorrer do ensaio nas Figuras V – 23 A, 23 B e 23 C. Dessa forma, concluiu-se que o transporte de nanopartículas foi realizado através da barreira celular para estas amostras. Já na Figura V - 23D foram observadas perdas de junção celular, confirmando a efetividade do tratamento químico com EDTA.

Os resultados obtidos no transporte utilizando o controle de células como branco de leitura estão dispostos na Tabela V - 11. O percentual de passagem foi calculado tomando-se como 100% a soma da leitura do compartimento apical e basal.

Tabela V - 11. Passagem percentual das nanopartículas em ensaio *Transwell*.

	Passagem de Nanopartículas no Teste Transwell (%) ± desvio padrão
Controle Positivo P(MMA-co-AA) 7,5%	24,80 ± 1,98
P(MMA-co-AA) 7,5%	27,10 ± 2,13
P(MMA-co-AA) 7,5% + TAT	23,64 ± 0,27
Controle Positivo P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R	24,40 ± 0,92
P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R	24,05 ± 0,03
P(MMA-co-AA) 7,5% + 1,5%R + TAT	23,60 ± 1,32
Controle de Membrana	50,13 ± 1,01

Observando os valores calculados na Tabela V - 11, notou-se que o valor obtido no controle de membrana apresentou a maior medida percentual de passagem de nanopartículas. Isto era esperado, já que neste caso não houve resistência da barreira celular; portanto, o transporte foi regido somente por gradiente de concentração. Como o valor percentual de passagem obtido foi de 50%, isto indicou que a membrana do suporte não apresentou resistência ao transporte, ao igualar as concentrações apicais e basais das nanopartículas.

Em relação aos controles positivos, em ambos os casos foram observados valores semelhantes. Dessa forma, inferiu-se que o percentual máximo possível para o transporte das nanopartículas através de uma barreira constituída por células do tipo *tight junction* foi de 25%. Adicionalmente, notou-se que o encapsulamento de rivastigmina não alterou o comportamento de deslocamento.

Os valores obtidos para as amostras não funcionalizadas com TAT e os de nanopartículas funcionalizadas apresentaram-se muito semelhantes, tanto para as amostras que continham quanto para as amostras que não continham rivastigmina encapsulada. Isto indicou que, para o intervalo de tempo analisado, a imobilização com peptídeo de internalização celular não resultou influência significativa para o transporte das nanopartículas. Como os valores obtidos também foram muito semelhantes aos obtidos pelos controles positivos, pode-se afirmar que foi transportada a máxima quantidade possível de nanopartículas tendo em vista a resistência celular. Dessa forma, sugere-se que a membrana apresentou algum grau de tolerância à passagem de partículas, entretanto contornado parcialmente sem a necessidade do auxílio de TAT. Uma hipótese seria que materiais nanoparticulados apresentem boa internalização celular devido ao seu tamanho reduzido. É possível que, somente para tamanhos particulados maiores, o peptídeo de internalização TAT pudesse agir de maneira mais significativa.

YANG *et al.* (2013) testaram o transporte de rivastigmina encapsulada em lipossomas funcionalizados com CPP's em células endoteliais de camundongo por 24 h. Apesar de apresentarem valores absolutos mais eficientes quando usados CPP's, estes resultados também não foram significativos quando considerados margens de erro estatísticos (YANG *et al.*, 2013). Entretanto, ZHAO *et al.* (2012) conseguiram utilizar o sistema do *Transwell* em células renais caninas para visualização de transporte de nanopartículas em 1 h, intervalo muito menor que o utilizado neste teste (ZHAO *et al.*, 2012). Assim, indica-se que outras variáveis podem ser exploradas para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na passagem de nanossistemas por barreiras fisiológicas.

Capítulo VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho visou ao encapsulamento de rivastigmina em nanopartículas poliméricas funcionalizadas para o emprego em liberação sítio-dirigida deste fármaco. A adoção da polimerização em miniemulsão permitiu síntese de nanopartículas de tamanhos considerados mais seguros para o objetivo terapêutico pretendido (menores que 100 nm). Além disso, a escolha do uso do copolímero P(MMA-co-AA) permitiu o emprego de materiais biocompatíveis com potencialidade de funcionalização. A biomolécula escolhida para bioconjugação, o peptídeo de internalização celular TAT, foi justificada tendo em vista o mecanismo diferenciado de passagem pela barreira hematoencefálica.

O estudo de diferentes proporções de ácido acrílico permitiu concluir que os teores empregados não alteram significativamente a conversão, o diâmetro de partícula e o potencial zeta das nanopartículas, em comparação com o homopolímero. As análises de FTIR e RMN permitiram confirmar a copolimerização mesmo em pequenos percentuais (menores que 5%), confirmando a síntese de nanossistemas funcionalizados com grupos ácidos para bioconjugação. Entretanto, para a reação com 15 %m/m de ácido acrílico, foram observados aglutinações poliméricas associadas ao mecanismo cinético da reação e possível polimerização de poli(ácido acrílico) na fase aquosa. Como o objetivo do trabalho era a síntese de látices poliméricos de estrutura homogênea, essa formulação foi descartada nas etapas seguintes do trabalho.

A potencialidade para carreamento de fármaco foi testada adicionando 0,5 %m/m do fármaco em reação *in situ* de homopolimerização e copolimerização com maiores proporções de ácido acrílico, visando observar os efeitos associados aos comonômeros. Apesar dos altos valores de eficiência de encapsulamento (maiores que 70%), ressalta-se a possível retenção do fármaco na nanopartícula durante o ensaio de eficiência. As análises de tamanho médio de partícula, FTIR e de RMN comprovaram a manutenção das características dos copolímeros, independentemente da adição de rivastigmina. Entretanto, a análise de GPC indicou formação de perfil bimodal, sugerindo síntese de cadeias poliméricas de tamanhos diferenciados para o copolímero preparado com 12 %m/m de ácido acrílico, associado

possivelmente à produção de PAA em solução. Isto indicou possível interação entre fármaco e comonômero, conclusão também sustentada pela obtenção de menor percentual de eficiência de encapsulamento na presença de AA.

Os testes de imobilização com lisina e TAT para copolímeros encapsulados com 0,5 %m/m de rivastigmina permitiram concluir que o fármaco não afeta o processo de funcionalização. Assim, refuta-se novamente a hipótese de adsorção superficial do fármaco e confirma-se o seu encapsulamento na matriz polimérica. Adicionalmente, comprovou-se que o uso de 12 %m/m de AA não resultou em ganho significativo de eficiência de bioconjugação.

A ausência de variação significativa do percentual de comonômero no processo de bioconjugação foi reafirmada posteriormente. O teste de imobilização de lisina em homopolímero e copolímeros preparados com 7,5 %m/m, 10 %m/m e 12 %m/m confirmou o ganho percentual de funcionalização com inserção de copolímeros ácidos. Entretanto, a variação de comonômero não foi muito relevante, possibilitando o uso de 7,5 %m/m de ácido acrílico na composição do protocolo de reação em miniemulsão.

Apesar do encapsulamento promissor de 0,5 %m/m de fármaco em copolímeros, novos testes de polimerização foram realizados visando ao aumento do teor mássico de rivastigmina no sistema. As reações puderam confirmar a hipótese anterior de ocorrência de interação entre ácido acrílico e fármaco, visto que reações com maior quantidade de fármaco só foram possíveis com menores teores de comonômero. O fármaco poderia intervir na solubilidade do ácido acrílico na fase orgânica, induzindo maior produção de poli(ácido acrílico) na fase aquosa, o que seria indesejado para os objetivos do estudo. Finalmente, foram obtidos maiores percentuais mássicos de encapsulamento, otimizando o composto final com 7,5 %m/m de ácido acrílico no meio de reação e 205,63 mg encapsulados.

O estudo de liberação *in vitro* foi aplicado para permitir melhor entendimento acerca do mecanismo de desprendimento de rivastigmina da matriz polimérica. Apesar da elaboração de uma metodologia mais sensível de quantificação, não foram observadas concentrações do fármaco no meio de liberação. Isto foi provavelmente ocasionado pela baixa dissolução do fármaco no meio, o que não foi averiguado previamente por testes de solubilidade.

Os estudos em linhagem celular Caco-2 permitiram verificar a citotoxicidade da nanopartícula sintetizada e sua capacidade em permear a barreira fisiológica. Concluiu-se que as nanopartículas apresentam toxicidade associada a outros elementos presentes na reação de síntese, como o surfactante ou o co-estabilizante. Entretanto, os níveis tóxicos encontrados nunca seriam encontrados em ambiente fisiológico real, devido à faixa de solubilidade do fármaco na corrente sanguínea. O teste de *Transwell* demonstrou que a capacidade de permeabilidade da nanopartícula não foi afetada pela imobilização de TAT, gerando a hipótese de que talvez outras características das nanopartículas sejam mais relevantes para o mecanismo de transporte que a imobilização com TAT.

Portanto, o nanossistema polimérico desenvolvido foi capaz de aumentar a capacidade mássica de carregamento do fármaco hidrofóbico rivastigmina, com valores máximos de conversão e reduzidos diâmetro de partícula e citotoxicidade associada. Dessa forma, estes resultados mostraram-se promissores para o desenvolvimento de carreadores poliméricos funcionalizados para tratamento do mal de Alzheimer.

6.1. Sugestões

Apesar da grande potencialidade dos nanocarreadores sintetizados neste estudo, ainda existem fatores a serem considerados. Em estudos futuros, os ensaios sugeridos estão detalhados a seguir:

- Investigação da interação existente entre ácido acrílico e fármaco: aplicar testes de solubilidade ou caracterização de propriedades superficiais, a fim de investigar reatividade entre os dois agentes químicos.
- Otimização de ensaios de liberação *in vitro*: estudar a solubilidade do fármaco no meio de liberação, estudar o uso de outros surfactantes para a dissolução do fármaco como PEG, PVA, entre outros. Além disso, otimizar outros parâmetros, como agitação, temperatura e pH do sistema na cinética de liberação do fármaco.
- Averigar outros fatores determinantes na toxicidade e capacidade de internalização celular: estudar a cinética de transporte em ensaios *Transwell*; modificar a estrutura da nanopartícula a partir do uso de diferentes estabilizantes, surfactantes e condições reacionais; usar outro modelo celular; e outra biomolécula sinalizadora, o que poderia contribuir com comportamentos biológicos diferenciados.

Capítulo VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUELMAGD, S. A. *et al.* Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: are we doing it right? **Molecular Pharmaceutics.**, 2015. v. 12, n. 3, p. 997–1003.
- ANAND, R.; GILL, K. D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of alzheimer’s disease: past, present and future. **Neuropharmacology**, 2014. v. 76, n. PART A, p. 27–50. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>>.
- ANNICCHIARICO, R. *et al.* Rivastigmine in alzheimer ’ s disease : cognitive function and quality of life. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 2007. v. 3, n. 6, p. 1113–1123.
- ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, 2002. v. 27, n. 4, p. 689–757.
- ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, 2002. v. 27, p. 1283–1346.
- ASUA, J. M. Emulsion polymerization: from fundamental mechanisms to process developments. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 2004. v. 42, n. 5, p. 1025–1041. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/pola.11096>>.
- BAHADAR, H. *et al.* Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. **Iranian Biomedical Journal**, 2016. v. 20, n. January, p. 1–11.
- BAYSAL, I. *et al.* Donepezil loaded plga-b-peg nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro. **Journal of Neural Transmission**, 2016. v. 124, n. 1, p. 1–13.
- BHATTACHARJEE, S. Review article dls and zeta potential – what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, 2016. v. 235, p. 337–351. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, 2015. v. 10, p. 975–999.
- CAMPOS-RAMOS, I. M. F. **Nanopartículas poliméricas para liberação de fármaco sítio-dirigida para o tratamento de doenças neurodegenerativas**. COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Qualificação de Doutorado.
- CAMPOS, I. M. F.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C.. Production and functionalization of p (mma-co-aa) nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Macromolecular Symposia**, 2016. v. 368, p. 70–77.

- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2a. ed. São Paulo, Artliber Editora, 2006.
- CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F. *et al.* Síntese de copolímeros metacrílicos através da modificação química do poli (metacrilato de metila) de massa molar controlada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1999. p. 156–162.
- CHEN, Y.; LIU. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2012. v. 64, n. 7, p. 640–665.
- CHEREMISINOFF, N. P. **Polymer Characterization - Laboratory Techniques and Analysis**. William Andrew, 1996.
- CHEVREL, M. C. *et al.* In situ monitoring of acrylic acid polymerization in aqueous solution using raman technique. experimental investigation and theoretical modelling. **Chemical Engineering Science**, 2014. v. 106, p. 242–252. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2013.11.039>>.
- CRAPARO, E. F. *et al.* A nanoparticulate drug-delivery system for rivastigmine: physico-chemical and in vitro biological characterization. **Macromolecular Bioscience**, 2008. v. 8, n. 3, p. 247–259.
- D'SOUZA, S. S.; DELUCA, P. P. Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. **Pharmaceutical Research**, 2006. v. 23, n. 3, p. 460–474.
- DAGE, J. L. *et al.* Levels of tau protein in plasma are associated with neurodegeneration and cognitive function in a population-based elderly cohort. **Alzheimer's and Dementia**, 2016. v. 12, n. 12, p. 1226–1234. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.06.001>>.
- EFTEKHARZADEH, B.; HYMAN, B. T.; WEGMANN, S. Structural studies on the mechanism of protein aggregation in age related neurodegenerative diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, 2016. v. 156, p. 1–13. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2016.03.001>>.
- ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, 2013. v. 41, n. 7, p. 2545–2561.
- FALLIS, A. . Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**, 2013, v. 53, p. 1689–1699.
- FAZIL, M. *et al.* Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2012. v. 47, n. 1, p. 6–15. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.013>>.
- FEUSER, P. E. *et al.* Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) pmma and evaluation of cytotoxicity for biomedical application. **Macromolecular Symposia**, 2014. v. 343, n. 1, p. 65–69.
- FONSECA-SANTOS, B. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of alzheimer's disease. **International Journal of Nanomedicine**, 2015. v. 10, p. 4981–5003. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/permissions.php>>.

- FONSECA, L. B. *et al.* Production of pmma nanoparticles loaded with praziquantel through “in situ” miniemulsion polymerization. **Macromolecular Reaction Engineering**, 2013. v. 7, n. 1, p. 54–63.
- GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Treatment of alzheimer ’ s disease : symptomatic and disease-modifying approaches. **Current Aging Science**, 2010. p. 46–56.
- GESZKE-MORITZ; MORITZ. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**, 2016. v. 68, p. 982–994.
- GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, 2007. v. 32, n. 7, p. 698–725.
- GOLDBLUM, D. *et al.* In vitro toxicity of rivastigmine and donepezil in cells of epithelial origin. **Ophthalmic Research**, 2002. v. 34, n. 2, p. 97–103.
- HACKLEY, V. A.; CLOGSTON, J. D. Measuring the size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering. Nist special publication 1200-6. **National Institute of Standards and Technology**, 2015. Disponível em: <<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST.SP.1200-6.pdf>>. Acesso em 5 de Janeiro de 2018.
- HANSEN, R. A. *et al.* Ef fi cacy and safety of donepezil , galantamine , and rivastigmine for the treatment of alzheimer ’ s disease : a systematic review and meta-analysis. **Clinical Interventions in Aging**, 2008. v. 3, n. 2, p. 211–225.
- HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. **Immobilized Affinity Ligand Techniques**. 1. ed., San Diego, Academic Press Inc., 1992.
- HERRERA *et al.* Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, 2002. v. 16, n. 2, p. 103–108.
- HICKMAN, R. A.; FAUSTIN, A.; WISNIEWSKI, T. Alzheimer disease and its growing epidemic: risk factors, biomarkers, and the urgent need for therapeutics. **Neurologic Clinics**, 2016. v. 34, n. 4, p. 941–953.
- HOLTZMAN, D. M. *et al.* Tau: from research to clinical development. **Alzheimer’s & Dementia : The Journal of the Alzheimer’s Association**, 2016. v. 12, n. 10, p. 1033–1039. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155252601630019X>>.
- HOLZAPFEL, V. *et al.* Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 2005. v. 206, n. 24, p. 2440–2449.
- JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2009. v. 61, n. 6, p. 438–456. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>>.

- JOSHI, S. A.; CHAVHAN, S. S.; SAWANT, K. K. Rivastigmine-loaded plga and pbca nanoparticles: preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. NULL: **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2010. v. 76, n. 2, p. 189–199. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.007>>.
- KANWAR, J. R. *et al.* Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2012. v. 8, n. 4, p. 399–414.
- KAUR, S. P. *et al.* Preparation and characterization of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2011. v. 3, n. 5, p. 1227–1232.
- KHANAM, H. *et al.* Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016. v. 124, p. 1121–1141. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.006>>.
- KIRILLOVA, A. *et al.* Self-assembly behavior of hairy colloidal particles with different architectures: mixed versus janus. **Langmuir**, 2014. v. 30, n. 43, p. 12765–12774.
- KREUTER, J.; TAUBER, U.; ILL, V. Radioactivity after injection in rats and mice. **American Pharmaceutical Association**, 1979. v. 68, n. 11, p. 1443–1447.
- KREUTER, J.; LIEHL, E. Long-term studies of microencapsulated and adsorbed influenza vaccine nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1981. v. 70, n. 4, p. 367–371.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001. v. 47, p. 65–81.
- KREUTER, J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2014. v. 71, p. 2–14. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.008>>.
- KROLL, A. *et al.* Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment : limitations and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2009. v. 72, p. 370–377.
- KULKARNI, P. V *et al.* Quinoline-n-butylcyanoacrylate- based nanoparticles for brain targeting for the diagnosis of alzheimer ' s disease. **Review Literature and Arts of the Americas**, 2010. v. 2, n. February, p. 35–47.
- KUMAR; SINGH; EKAVALI. A review on alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, 2015. v. 67, n. 2, p. 195–203. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>>.
- LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2009. v. 48, n. 25, p. 4488–4508.
- LAO, L. L. *et al.* Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, 2011. v. 418, n. 1, p. 28–41. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.020>>.

- LIU, L. *et al.* Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated peg-tat for drug delivery across the blood-brain barrier. **Biomaterials**, 2008. v. 29, n. 10, p. 1509–1517.
- LORCA, B. S. S. *et al.* Preparation of pmma nanoparticles loaded with benzophenone-3 through miniemulsion polymerization. **Macromolecular Symposia**, 2012. v. 319, n. 1, p. 246–250.
- MAHAJAN, H. S. *et al.* Nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of saquinavir mesylate for brain targeting. **Drug Delivery**. 2014. v. 21, n. 2, p. 148–154. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2013.838014>>.
- MALHOTRA, M.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; PRAKASH, S. Synthesis of tat peptide-tagged pegylated chitosan nanoparticles for sirna delivery targeting neurodegenerative diseases. **Biomaterials**, 2013. v. 34, n. 4, p. 1270–1280. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.013>>.
- MASSERINI, M. Nanoparticles for brain drug delivery. **ISRN Biochemistry**, 2013. p. 1–18. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/238428/>>.
- MOREIRA, T. S. A. *et al.* Synthesis of nanoparticles loaded with tamoxifen by in situ miniemulsion raft polymerization. **Macromolecular Symposia**, 2014. v. 344, n. 1, p. 101–107.
- MOUT, R. *et al.* Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, 2012. v. 41, n. 7, p. 2539. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15294k>>.
- MULLANE, K.; WILLIAMS, M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis - but what lies beyond? **Biochemical Pharmacology**, 2013. v. 85, n. 3, p. 289–305. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.014>>.
- MULLER, T. Rivastigmine in the treatment of patients with alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, 2007. v. 3, n. 2, p. 211-218.
- NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Optimization of brain targeted chitosan nanoparticles of rivastigmine for improved efficacy and safety. **International Journal Of Biological Macromolecules**, 2013. v. 59, p. 72–83. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.024>>.
- NICOLINI, J. V.; FERRAZ; RESENDE. Immobilization of horseradish peroxidase on titanate nanowires for biosensing application. **Journal of Applied Electrochemistry**, 2016. v. 46, n. 1, p. 17–25.
- NITRINI, R. *et al.* Incidence of dementia in a community-dwelling brazilian population. **Alzheimer Disease Associates Disorders**. 2004. v. 18, n. 4, p. 241–246.
- NOUNOU, M. M. *et al.* In vitro release of hydrophilic and hydrophobic drugs from liposomal dispersions and gels. **Acta Pharmaceutica**. 2006. v. 56, p. 311–324.
- NOVARTIS BIOCÍÊNCIAS. **Exelon Patch®: Rivastigmina**. Disponível em: <<https://portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/1773.pdf>>. Acesso em 20 de Dezembro de 2017. Bula de remédio.

- NOVARTIS BIOCÊNCIAS. **Exelon: Rivastigmina.** Disponível em: <<https://portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/1843.pdf>>. Acesso em 20 de Dezembro de 2017. Bula de remédio.
- OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* In-situ incorporation of amoxicillin in pva/pvac-co-pmma particles during suspension polymerizations. **Macromolecular Symposia**, 2011. v. 299–300, n. 1, p. 34–40.
- OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* In situ incorporation of doxorubicin in copolymer particles during suspension polymerization. **Macromolecular Symposia**, 2012a. v. 319, n. 1, p. 23–33.
- OLIVEIRA, M. A. M. *et al.* Suspension copolymerization of vinyl acetate and methyl methacrylate in the presence of amoxicillin. **Macromolecular Reaction Engineering**, 2012b. v. 6, n. 6–7, p. 280–292.
- ONOR, M. L.; AGUGLIA, E. Rivastigmine in the treatment of alzheimer’s disease : an update. **Clinical Interventions in Aging**, 2007. v. 2, n. 1, p. 17–32.
- PAGAR, K.; VAVIA, P. Rivastigmine-loaded l-lactide-depsipeptide polymeric nanoparticles: decisive formulation variable optimization. **Scientia Pharmaceutica**, 2013. v. 81, n. 3, p. 865–885.
- PAIVA, T.; MELO, P.; PINTO. Comparative analysis of sunscreen nanoencapsulation processes. **Macromolecular Symposia**, 2016. v. 368, n. 1, p. 60–69.
- PANWAR, P. *et al.* Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, 2010. v. 5, p. 101–108.
- PARK, K. The controlled drug delivery systems: past forward and future back. **Journal of Control Release**, 2014. v. 190, p. 3–8.
- PEIXOTO, A. C. B. *et al.* Use of hydrophilic monomers to avoid secondary particle nucleation in miniemulsion polymerizations of methyl methacrylate. **Journal of Research Updates in Polymer Science**, 2016. v. 5, p. 60–71.
- PICHOT, C. Surface-functionalized latexes for biotechnological applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 2004. v. 9, n. 3–4, p. 213–221.
- PRINCE, M. *et al.* World alzheimer report 2016 improving healthcare for people living with dementia. coverage, quality and costs now and in the future. 2016. p. 1–140. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>>. Acesso em 03 de novembro de 2017
- RAGNAILL, M. N. *et al.* Internal benchmarking of a human blood–brain barrier cell model for screening of nanoparticle uptake and transcytosis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2011. v. 77, n. 3, p. 360–367. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.024>>.
- RAO, K. S. *et al.* Tat-conjugated nanoparticles for the cns delivery of anti-hiv drugs. **Biomaterials**, 2008. v. 29, n. 33, p. 4429–4438.
- RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. Â. De. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, 2007. v. 30, n. 4, p. 1026–1031.

- RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols**, 2011, v. 740, p. 103–114.
- RODDA, A. E. *et al.* Specific control of cell-material interactions: targeting cell receptors using ligand-functionalized polymer substrates. **Progress in Polymer Science**, 2014. v. 39, n. 7, p. 1312–1347. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.006>>.
- SADAT, S. M. A.; JAHAN, S. T.; HADDADI, A. Effects of size and surface charge of polymeric nanoparticles on in vitro and in vivo applications. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, 2016. v. 7, n. 2, p. 91–108. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jbnb.2016.72011>>.
- SANTOS, A. M.; HABERT, A.; FERRAZ, H. C. Development of functionalized polyetherimide/polyvinylpyrrolidone membranes for application in hemodialysis. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2017. v. 28, n. 9, p. 1–9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-017-5946-z>>.
- SARAIVA, C. *et al.* Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release**, 2016. v. 235, p. 34–47. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>>.
- SCAZUFCA, M. *et al.* Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. **Revista De Saúde Pública**, 2002. v. 36, n. 6, p. 773–778.
- SCHAFFAZICK, S. R. . *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 2003. v. 26, n. 5, p. 726–737.
- SCIALABBA, C. *et al.* Amphiphilic polyaspartamide copolymer-based micelles for rivastigmine delivery to neuronal cells for rivastigmine delivery to neuronal cells. **Drug Delivery**, 2012. v. 19, n. 6, p. 307–316.
- SHASTRI, V. P. Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2003. v. 4, n. 5, p. 331–337.
- SILVA, F. H. De A. **Estudo sobre a interação de bactérias redutoras de sulfato com células epiteliais intestinais: influência sobre junções celulares e imunorregulação**. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2014. Dissertação.
- SINGH, R; LILLARD, J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental Molecular Pathology**, 2009. v. 86, n. 3, p. 215–223.
- THICKETT, S. C.; GILBERT, R. G. Emulsion polymerization: state of the art in kinetics and mechanisms. **Polymer**, 2007. v. 48, n. 24, p. 6965–6991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2007.09.031>>.
- TOSI, G. *et al.* The “fate” of polymeric and lipid nanoparticles for brain delivery and targeting: Strategies and mechanism of blood-brain barrier crossing and trafficking into the central nervous system. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2016, v. 32, p. 66-76.

- VIJAYKUMAR, O.; JOE, V. F.; VISHWANATH, B. A. Formulation and evaluation of rivastigmine loaded polymeric nanoparticles. **Journal of Chemical & Pharmaceutical Research**, 2014. v. 6, n. 10, p. 556–565.
- WELSCH, N. *et al.* Adsorption of proteins to functional polymeric nanoparticles. **Polymer (United Kingdom)**, 2013. v. 54, n. 12, p. 2835–2849. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.03.027>>.
- WILSON, B. *et al.* Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat alzheimer's disease. **Brain Research**, 2008. v. 1200, p. 159–168.
- WIMO, A. *et al.* The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. **Alzheimer's & Dementia**, 2016. v. 13, n. August, p. 1–7.
- WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 2012. v. 161, n. 2, p. 264–273. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017>>.
- YANG *et al.* Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, ago. 2013. v. 452, n. 1–2, p. 344–354. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313004080>>.
- YAO, F.; WEIYUAN, J. K. Drug release kinetics and transport mechanisms of non- degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion Drug Delivery**, 2010. v. 7, n. 4, p. 429–444.
- YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIU, S. G. Current and future treatments for alzheimer's disease. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, 2013. v. 6, p. 19–33. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- YUSUF, M. *et al.* Preparation, characterization, in vivo and biochemical evaluation of brain targeted piperine solid lipid nanoparticles in an experimentally induced alzheimer's disease model. **Journal of Drug Targeting**, 2013. v. 21, n. 3, p. 300–311.
- ZHAO, S. *et al.* A novel and facile approach to imaging nanoparticles transport across transwell filter grown cell monolayer in real-time and in situ under confocal laser scanning microscopy. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2012. v. 35, n. 3, p. 335–345.
- ZHENG, X. *et al.* A hybrid sirna delivery complex for enhanced brain penetration and precise amyloid plaque targeting in alzheimer's disease mice. **Acta Biomaterialia**, 2016. v. 49, p. 388–401. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706116306250>>.
- ZOU, L.-L. *et al.* Cell-penetrating peptide-mediated therapeutic molecule delivery into the central nervous system. **Current Neuropharmacology**, 2013. v. 11, n. 2, p. 197–208. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3637673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

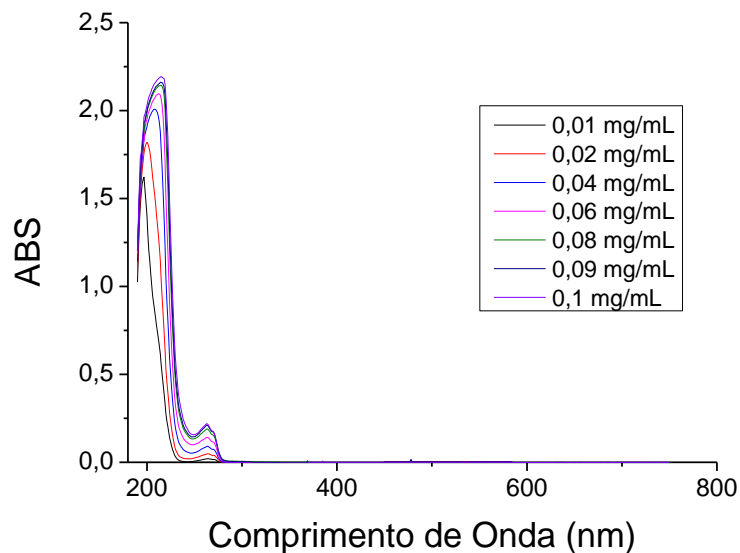
ANEXO A – QUANTIFICAÇÃO DE RIVASTIGMINA

Figura A - 1. Espectros de soluções aquosas de rivastigmina base livre com diferentes concentrações (mg/mL).

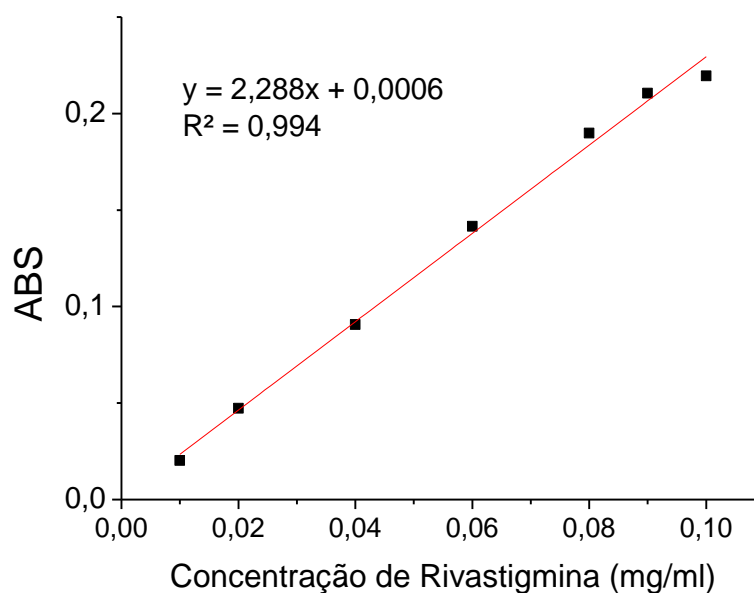


Figura A - 2. Curva padrão de calibração de rivastigmina base livre em 263 nm.

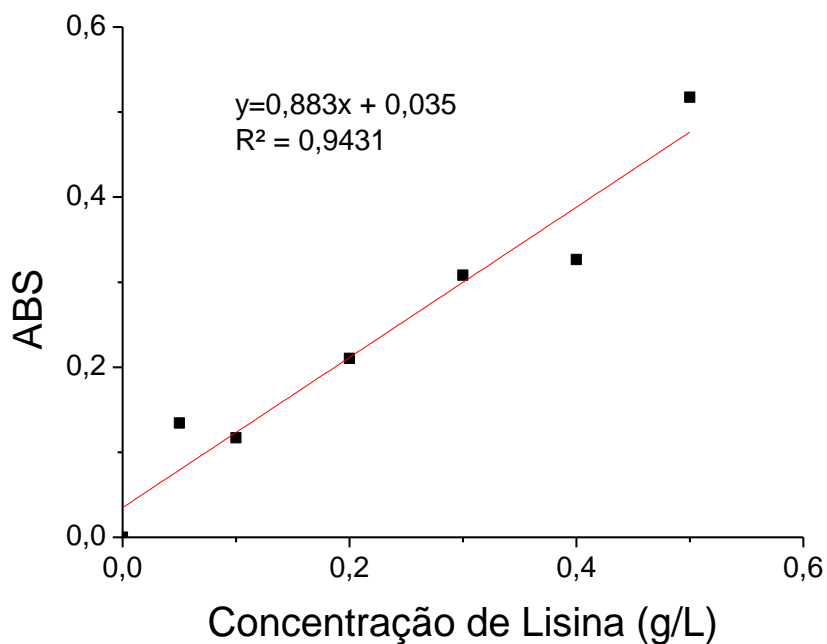
ANEXO B – QUANTIFICAÇÃO DE LISINA E TAT

Figura B - 1. Curva padrão obtida para determinação de lisina em 340 nm.

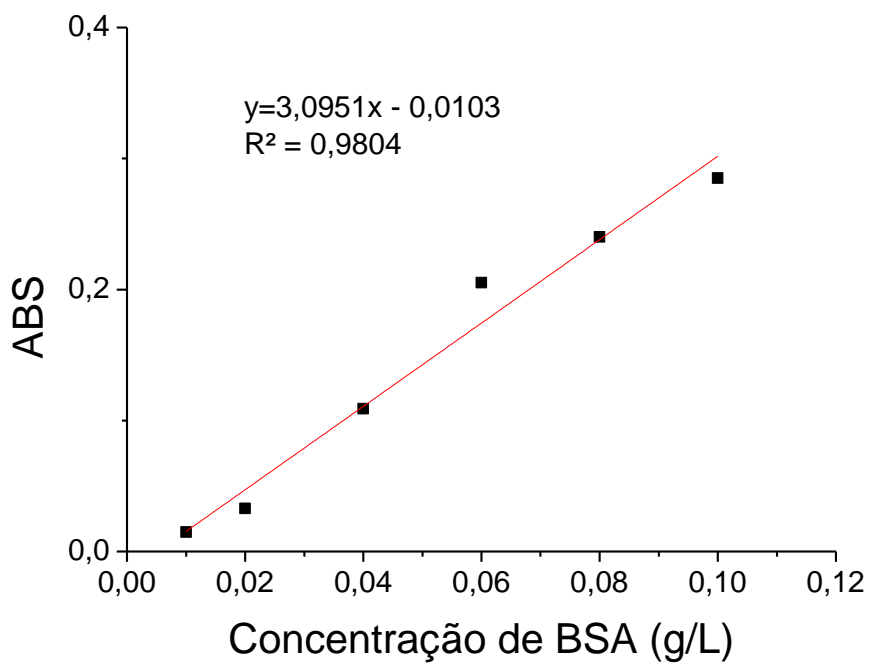


Figura B - 2. Curva padrão obtida de BSA para determinação de TAT em 595 nm.

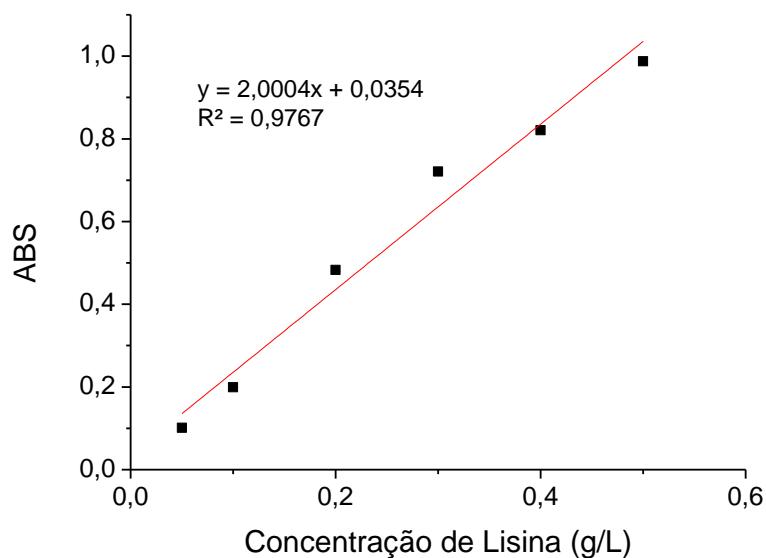
ANEXO C – QUANTIFICAÇÃO DE LISINA E TAT***Novo Reagente***

Figura C - 1. Curva padrão obtida para determinação de lisina com novo reagente em 340 nm.

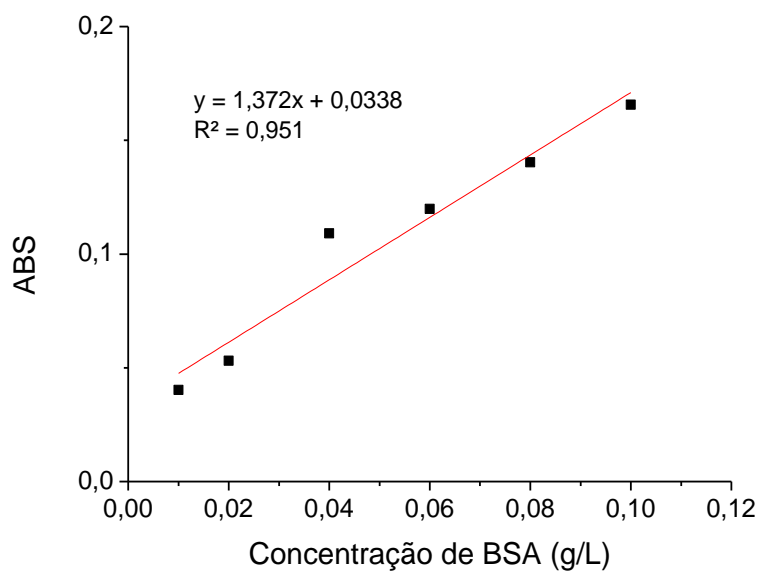


Figura C - 2. Curva padrão obtida de BSA para determinação de TAT com novo reagente em 595 nm.

ANEXO D – QUANTIFICAÇÃO DE RIVASTIGMINA POR HPLC

Como não foi encontrado na literatura uma metodologia padrão para quantificação de rivastigmina base livre, foi necessário construir um método analítico. Para isso, adotou-se água acidificada e acetonitrila como fase móvel e a diluição do fármaco foi feita em água destilada. Os cromatógrafos obtidos para a amostra mais diluída e mais concentrada estão dispostos abaixo. Conforme observado, a rivastigmina apresentou um pico de retenção mais pronunciado em 2,1 minutos, sendo este o escolhido para a construção de curva padrão.

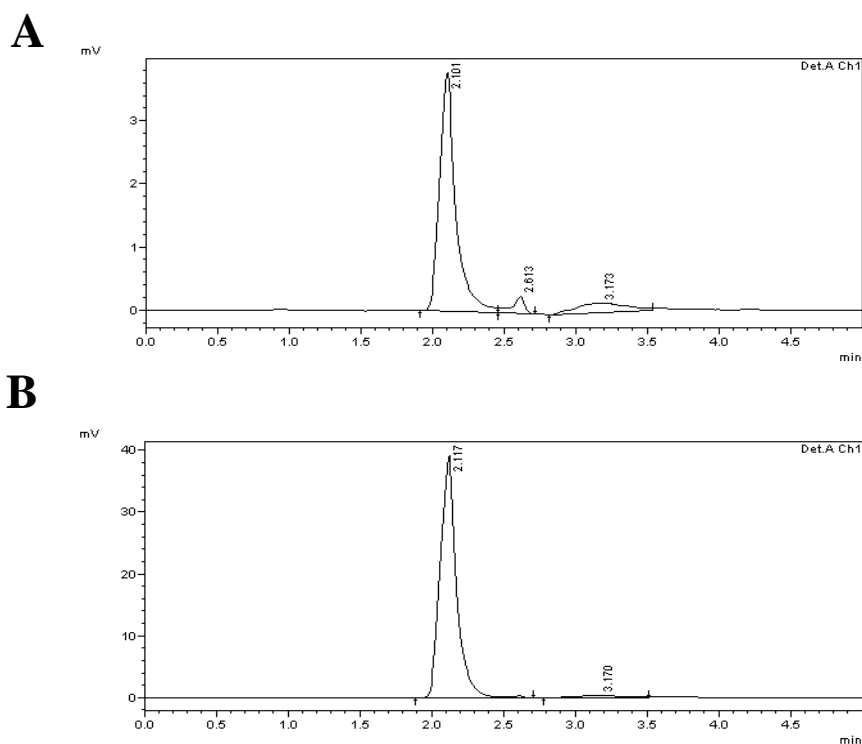


Figura D - 1. Cromatógrafos obtidos para curva padrão de quantificação de rivastigmina base livre em HPLC. (A) 0,0025 mg/mL; (B) 0,05 mg/mL.

A curva padrão obtida associando a concentração de fármaco vs área do pico de retenção está ilustrada a seguir.

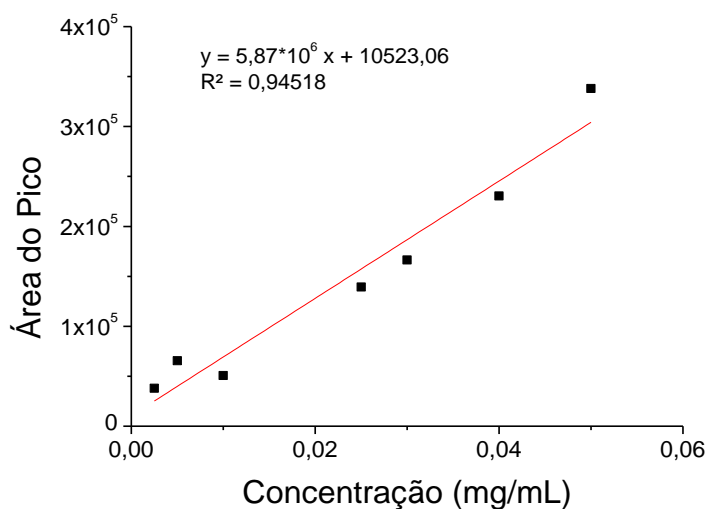


Figura D - 2. Curva padrão de calibração de rivastigmina base livre em HPLC.

Apesar do bom coeficiente de correlação obtido (acima de 0,9), notou-se que há perda de linearidade para amostras muito próximas dos valores mínimos da curva. Dessa forma, coube-se fazer uma ressalva para uso de amostras muito diluídas. Ainda sim, a construção da curva padrão em HPLC foi satisfatória como metodologia de quantificação de rivastigmina em experimento de liberação.