

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanocápsulas funcionalizadas com o tripeptídeo LDV para a
vetorização ativa de um agente antineoplásico visando o tratamento de câncer

CAMILA FRANCO

PORTO ALEGRE
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanocápsulas funcionalizadas com o tripeptídeo LDV para a
vetorização ativa de um agente antineoplásico visando o tratamento de câncer

Tese apresentada por **Camila Franco** para obter o
Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Raffin Pohlmann

Co-orientador: Dr. Gustavo Pozza Silveira

Colaboradores: Dr^ª. Marli Luiza Tebaldi

Dra. Silvia S. Guterres

Dra. Andreia Buffon

Porto Alegre

2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21 de janeiro de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Marilise Escobar Bürger

Universidade Federal de Santa Maria/PPG Farmacologia

Prof. Dr. Raquel Santos Mauler

Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGQ

Prof. Dr. Valdir Soldi

Universidade Federal de Santa Catarina/PPGQMC

Prof. Dr. Vera Lucia Eifler Lima

Universidade Federal do Rio Grande do Sul/PPGCF

CIP - Catalogação na Publicação

Franco, Camila

Desenvolvimento de nanocápsulas funcionalizadas com o tripeptídeo LDV para a vetorização ativa de um agente antineoplásico visando o tratamento de câncer / Camila Franco. -- 2015.

192 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Coorientadora: Gustavo Pozza Silveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA) 2. 2. ATRP-ARGET. 3. Nanocápsulas poliméricas. 4. Doxorrubicina. 5. Vetorização. I. Raffin Pohlmann, Adriana, orient. II. Pozza Silveira, Gustavo, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais e meu companheiro
Thiago, por seu apoio ao longo dessa trajetória e incentivo
Incondicional em todos momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades de aprendizado e profissionais durante nesse período de doutorado.

À profa. Adriana Raffin Pohlmann por sua orientação acadêmica e profissional e, amizade, por acreditar no trabalho e confiar em minha capacidade para executá-lo e à profa. Marli Tebaldi que teve grande importância como mestra e amiga, em todos os momentos, inclusive nos difíceis. Guardo vocês no meu coração com saudades.

Ao prof. Gustavo Pozza Silveira e à profa. Andréia Buffon por suas colaborações e atenção ao trabalho.

Agradeço também aos colegas Aline Beckenkamp, Micheli Barcelos Antonow, Ana Carolina Ashbar, Natália Mendonça, Francisco Noé Fonseca, William Prado, Stella Ferranini, Kenia Pissinate e apoio/incentivo dos demais colegas do laboratório K204 do IQ/UFRGS e do laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Agradeço aos funcionários da UFRGS Joyce e Fabiana Grosser que muito colaboraram para a obtenção dos meus resultados, assim como Sr. Edson e Carlos do setor de almoxarifado e Raul Fernandes do setor de compras.

Às instituições de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos.

Não posso deixar de agradecer também aos colegas, coordenadores e pró-reitores do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA/Santa Maria) por todo o apoio, compreensão e ajustes que permitiram que eu realizasse o doutorado em paralelo ao trabalho.

E, também, aos meus pais: Gentil B. Franco e Edir L. Bisognin e, irmão Fabiano B. Franco, às minhas tias Vanilde, Eleni e Benigna Bisognin e à meu noivo Thiago Ivan Freitas Nunes pelo apoio incondicional.

Obrigada a todos por cada palavra dita no percurso do doutorado, seja para o aprimoramento do trabalho, seja para o amadurecimento e crescimento como profissional e, principalmente, para superar as dificuldades.

RESUMO

O **objetivo** do presente estudo visa o desenvolvimento de um copolímero em bloco constituído por metacrilato de metila (MMA) e de dimetilaminoetila (DMAEMA), tendo como macroniciador poli- ϵ -caprolactona dibromada (Br-PCL-Br), e que permite formar nanocápsulas sensíveis ao pH, contendo ou não o tripeptídeo leucina-ácido aspártico-valina (LDV) na superfície para a vetorização ativa de anti-neoplásicos. Os **métodos** envolveram diferentes abordagens sintéticas testadas, sendo que a técnica de transferência eletrônica por regeneração de ativadores (ATRP-ARGET) permitiu obter o copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ de forma mais prática e com rendimentos entre 30 e 70%. Por fim, o tripeptídeo LDV foi conjugado ao copolímero por meio do ligante metacrilato de 2-isocianato de etila (IEM). Um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi adaptado para a quantificação da doxorrubicina e as nanopartículas foram preparadas por nanoprecipitação e avaliadas quanto à capacidade de expandir em diferentes pHs e citotoxicidade em células de câncer de mama. Os **resultados** do copolímero demonstram, por análises de infravermelho (IR-FT), sinais característicos em 2900 cm⁻¹ e 1720 cm⁻¹ correspondentes às funções -CH e -C=O. A análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) mostra a caracterização das cadeias hidrocarbônicas do copolímero, sendo que os deslocamentos químicos em 2,8 ppm e 3,8 ppm correspondem aos sinais dos grupamentos -CH₂-N do DMAEMA e -O-CH₃ do MMA. As nanocápsulas preparadas a partir do copolímero expandiram de diâmetro quando expostas à pH ácido. Uma vez que o PMMA foi identificado como componente mais citotóxico, o copolímero foi otimizado por meio da redução da quantidade de MMA. A quantificação da doxorrubicina encapsulada nas nanopartículas preparadas a partir dos copolímeros não otimizado (ARGET-A) e otimizado (ARGET-B) foi de 61,42% e 64,88%, respectivamente. No estudo de citotoxicidade, as nanopartículas preparadas a partir do copolímero ARGET-B apresentaram-se eficazes no controle da proliferação celular de MCF-7. **Conclui-se** que o método de síntese ATRP-ARGET-B foi o mais apropriado para a produção do copolímero empregado no desenvolvimento de nanopartículas pH responsivas eficazes no

controle da proliferação de células tumorais. Ainda, existe a possibilidade do emprego do copolímero contendo o tripeptídeo LDV para alcançar uma vetorização ativa em células de câncer por meio da interação com integrinas específicas. Entretanto, até o presente, não foi realizada a avaliação das nanopartículas contendo LDV.

PALAVRAS-CHAVE: Copolímero. ATRP-ARGET. Nanocápsulas poliméricas. Vetorização. Doxorrubicina.

Development of functionalized nanocapsules with LDV tripeptide for active vectorization of an antineoplastic agent looking for cancer treatment

ABSTRACT

The **objective** of the present study looks for the development of a block copolymer constituted by methyl methacrylate (MMA) and dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA), having poly- ϵ -caprolactone dibromated (Br-PCL-Br) as a macroinitiator and, that could form pH sensible nanocapsules with or without the tripeptide leucine-aspartic acid-valine (LDV) in its surface for active vectorization of anti-neoplasics. The **methods** employed different synthetic approaches tested, being that the activator regenerated by electron transfer technique (ATRP-ARGET) allowed to obtain the copolymer PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ in a practical way and with incomes between 30 and 70%. Finally, the tripeptide LDV was linked to the copolymer through the 2-isocyanatoethyl methacrylate (IEM). A high performance liquid chromatography method (HPLC) was adapted to doxorubicin quantification and, the nanoparticles were prepared by nanoprecipitation and evaluated concerning its ability to expand in different environments and cytotoxicity in mammary cancer cells. The **results** from the copolymer demonstrated, by infrared (FT-IR), characteristic signals of 2900 cm⁻¹ and 1720 cm⁻¹ from the functions -CH and -C=O. And hydrogen nuclear magnetic resonance (RMN ¹H) analysis allowed the characterization of the hydrogen-carbonic chains of the copolymer, being that the chemical displacement in 2,8 ppm and 3,8 ppm corresponds to the signals of the groups -CH₂-N from DMAEMA and -O-CH₃ from MMA. The nanocapsules prepared from the copolymer expanded its diameter when exposed to acidic pH. Once PMMA was identified as the most toxic component the copolymer was optimized by the reduction of MMA amount. Doxorubicin quantification in the nanocapsules prepared with the copolymers not optimized (ARGET-A) and optimized (ARGET-B) was 61,42% and 64,88%, respectively. In the cytotoxicity study, the nanocapsules prepared from copolymer ARGET-B showed to be efficient to control the cellular proliferation of MCF-7. It can be **concluded** that the ATRP-ARGET-B method was the more appropriate one for the copolymer production, which was employed in nanocapsules pH responsive effective to control

tumor proliferation. Besides, there is the possibility to use the copolymer functionalized with LDV to achieve an active delivery to cancer cells by its interaction with specific integrins. However, till the present, it was not realized the evaluation of the nanocapsules with LDV.

KEY-WORDS: Copolymer, ARGET-ATRP, Polymeric nanocapsules, Vectorization, Doxorubicin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Polímeros metacrílicos empregados em carreadores para o tratamento de câncer.....	20
Tabela 2. Massas molares por GPC para PCL diol e macroiniciadores.....	61
Tabela 3. Formulações de nanopartículas com copolímero MLT20 (ATRP).....	123
Tabela 4. Formulações de nanopartículas com copolímero ARGET-A.....	124
Tabela 5. Formulações empregadas no estudo de atividade biológica.....	125
Tabela 6. Protocolo de exatidão para 1-NC-Dox.....	127
Tabela 7. Protocolo de exatidão para 2-NC-Dox.....	128
Tabela 8. Diâmetros de NC1, NC3 e NC3F2 em diferentes pHs por DLS.....	133
Tabela 9. Tamanho de partícula de NC 7 e NC17 por DLS.....	136
Tabela 10. Análise de difração a laser nas nanocápsulas brancas e com doxorrubicina.....	140
Tabela 11. Diâmetros por DLS das nanocápsulas em diferentes pHs.....	141
Tabela 12. Diâmetros por CONTIN das nanocápsulas.....	142
Tabela 13. Média das áreas das concentrações da curva de calibração por CLAE.....	143
Tabela 14. Parâmetros da análise de regressão da curva de CLAE.....	144
Tabela 15. Resultados de exatidão.....	145
Tabela 16. Resultados da precisão intermediária.....	146
Tabela 17. Resultados da repetibilidade.....	146
Tabela 18. Quantificação de doxorrubicina em nanocápsulas por CLAE.....	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação de integrinas por citocinas.....	17
Figura 2. Estrutura molecular do cloridrato de doxorrubicina.....	18
Figura 3. Efeito de nanocarreadores em tumores.....	21
Figura 4. Comportamento de nanocápsulas de PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂ em diferentes pHs.....	22
Figura 5. Etapas do estudo.....	25
Figura 6. Síntese do macroiniciador.....	45
Figura 7. Polimerização de PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂	47
Figura 8. Formação de dipeptídeos.....	51
Figura 9. Esterificação metílica do LDV.....	53
Figura 10. Reação LDV-IEM.....	54
Figura 11. Reação ARGET-B-IEM-LD(OMe)V(OMe).....	55
Figura 12. Infravermelho da PCL diol, MIAT1 e MIT2 (filme)	57
Figura 13. RMN ¹ H de MIT2 (CDCl ₃ , 300 MHz)	59
Figura 14. RMN ¹³ C MIT2 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	60
Figura 15. GPC de PCL diol, MIAT1 e MIT2.....	61
Figura 16. Infravermelho MLT-20 (filme).....	62
Figura 17. GPC do copolímero MLT20.....	62
Figura 18. RMN ¹ H do copolímero MLT-20 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	63
Figura 19. RMN ¹³ C do copolímero MLT-20 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	64
Figura 20. GPC de MLT20/CF01.....	65
Figura 21. Infravermelho de MLT20/CF01 (filme).....	66
Figura 22. RMN ¹ H de MLT20/CF01 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	67
Figura 23. GPC de MLT20/CF02	68
Figura 24. Infravermelho de MLT20/CF02 (filme).....	69
Figura 25. RMN ¹ H de MLT20/CF02 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	70
Figura 26. Infravermelho do copolímero ARGET-A (filme).....	71
Figura 27. GPC do copolímero ARGET-A	72
Figura 28. RMN ¹ H do copolímero ARGET-A (CDCl ₃ , 300 MHz).....	73
Figura 29. RMN ¹³ C do copolímero ARGET-A (CDCl ₃ , 300 MHz).....	74
Figura 30. Infravermelho do copolímero ARGET-B.....	75
Figura 31. RMN ¹ H do copolímero ARGET-B (CDCl ₃ , 300 MHz).....	76
Figura 32. Infravermelho de L-valina e L-ValOMe.HCl (filme).....	77
Figura 33. RMN ¹ H de L-ValOMe.HCl (CDCl ₃ , 300 MHz).....	78
Figura 34. Infravermelho de BocAsp(OBn)OH e BocAsp(OBn)ValOMe (filme).....	79
Figura 35. RMN ¹ H de BocAsp(OBn)ValOMe (CDCl ₃ , 300 MHz).....	80
Figura 36. Infravermelho de FmocAsp(OtBu)OH e FmocAsp(OtBu)ValOMe.....	81
Figura 37. RMN ¹ H de FmocAsp(OtBu)ValOMe (CDCl ₃ , 300 MHz).....	82
Figura 38. RMN ¹ H da desproteção de Boc-dipeptídeo (CDCl ₃ , 300 MHz).....	83
Figura 39. RMN ¹ H da desproteção de Fmoc-dipeptídeo (D ₂ O, 300 MHz).....	84
Figura 40. Infravermelho do LDV e LD(OMe)V(OMe).....	85
Figura 41. RMN ¹ H do LDV e LD(OMe)V(OMe) (CDCl ₃ , 300 MHz).....	86
Figura 42. Infravermelho de IEM-LD(OMe)V(OMe).....	88

Figura 43. RMN ¹ H de IEM-LD(OMe)V(OMe) (CDCl ₃ , 300 MHz).....	88
Figura 44. RMN ¹ H do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA-IEM-LD(OMe)V(OMe)) ₂ (CDCl ₃ , 300 MHz).....	90
Figura 45. Perfil de distribuição de tamanho por difração a laser das nanopartículas preparadas a partir do copolímero sintetizado por ATRP.....	131
Figura 46. Diâmetros de difração a laser das nanopartículas de MLT20.....	134
Figura 47. Alterações de diâmetros de NC1, NC3 e NC3F2 em diferentes pHs.....	134
Figura 48. Perfil de distribuição de tamanho por difração a laser das nanopartículas preparadas a partir do copolímero ARGET-A.....	135
Figura 49. Distribuição de diâmetros por DLS em diferentes pH para NC7 e NC17.....	137
Figura 50. IC ₅₀ de soluções de cloridrato de doxorrubicina em MCF-7.....	138
Figura 51. Difração a laser das nanopartículas submetidas à avaliação biológica.....	139
Figura 52. Perfil cromatográfico do cloridrato de doxorrubicina por CLAE.....	142
Figura 53. Curva de calibração do cloridrato de doxorrubicina por CLAE.....	143
Figura 54. Cromatograma da especificidade de nanocápsulas brancas.....	144
Figura 55. Citotoxicidade 1-NC e 1-NC-Dox por ASS.....	148
Figura 56. Citotoxicidade dos excipientes.....	150
Figura 57. Citotoxicidade 2-NC e 2-NC-Dox por ASS.....	152
Figura 58. Citotoxicidade de 1-NC-Dox (a) e 2-NC-Dox (b) por concentração de doxorrubicina em comparação à solução do cloridrato de doxorrubicina.....	153
Figura 59. RMN ¹ H de PCL diol (CDCl ₃ , 300 MHz).....	177
Figura 60. Infravermelho de MMA.....	177
Figura 61. Infravermelho de DMAEMA.....	178
Figura 62. RMN ¹ H de MMA (CDCl ₃ , 300 MHz).....	178
Figura 63. RMN ¹ H de DMAEMA (CDCl ₃ , 300 MHz).....	179
Figura 64. RMN ¹ H de L-valina (CDCl ₃ , 300 MHz).....	179
Figura 65. RMN ¹ H de BocAsp(OBn)OH (CDCl ₃ , 300 MHz).....	180
Figura 66. RMN ¹ H de FmocAsp(OtBu)OH (CDCl ₃ , 300 MHz).....	180
Figura 67. RMN ¹ H de MIAT1 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	181
Figura 68. RMN ¹ H de ARGET-A tratada com isopropanol (CDCl ₃ , 300 MHz).....	181
Figura 69. Infravermelho e GPC de PMMA e PDMAMEMA.....	183
Figura 70. RMN ¹ H de PMMA e PDMAEMA (CDCl ₃ , 300 MHz).....	184
Figura 71. Infravermelho de CF01.....	185
Figura 72. GPC de CF01.....	186
Figura 73. RMN ¹ H de CF01 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	186
Figura 74. Infravermelho de DBS.....	187
Figura 75. GPC de DBS.....	188
Figura 76. RMN ¹ H de DBS (CDCl ₃ , 300 MHz).....	188
Figura 77. Infravermelho de IEM-Leu(OMe).....	189
Figura 78. RMN ¹ H de Leu(OMe) e IEM-Leu(OMe) (CDCl ₃ , 300 MHz).....	190

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações por ATRP.....	32
Esquema 2. Reação por ATRP-ARGET.....	35
Esquema 3. Ligação do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂ com LDV e possíveis espaçadores.....	41
Esquema 4. Esterificação metílica da L-valina.....	50
Esquema 5. Protocolo de desenvolvimento de formulações.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida	KQAGDV e KGD: peptídeos
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária	L: lipossomo
ASS: área específica superficial	L-Val(OMe).HCl: cloridrato do éster metílico de valina
ATRP: polimerização radicalar por transferência de átomo	LCST: temperatura de solução crítica inferior
ATRP-ARGET: polimerização radicalar por transferência eletrônica por regeneração de ativadores	LD: limite de detecção
ATRP-ARGET-A ou B: copolímeros PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂	LQ: limite de quantificação
BocAsp(OBn)OH: ácido aspártico com grupamentos de proteção	LDV ou Leu-Asp-Val: leucina-ácido aspártico-valina
BocAsp(OBn)Val(OMe): dipeptídeo ácido aspártico-valina com grupamentos de proteção	Log D = coeficiente de distribuição
BRCA 1 e BRCA2: genes que originam câncer de mama	M: monômero
BRINE: solução de cloreto de sódio a 28%	MI: macroiniciador
CuBr: brometo de cobre	MIAT1: macroiniciador antigo (7dias) Br-PCL-Br após tratamento 1
CF01: copolímero PCL-P(DMAEMA) ₂ produzido por ATRP	MIT1: macroiniciador (3 dias) Br-PCL-Br após tratamento 1
CCD: cromatografia em camada delgada	MIT2: macroiniciador (3 dias) Br-PCL-Br após tratamento 2
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência	MCF-7: células de câncer de mama, MCF-7/ADR (resistentes à doxorrubicina)
DBS1: copolímero PCL-P(DMAEMA) ₂ produzido por ATRP	MLT20: copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂ produzido por ATRP
DCC: ciclohexilcarbodiimida	MLT20/CF01 e MLT20/CF02: copolímeros PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂ produzidos por ATRP
DCU: ciclohexilurea	MMA: metacrilato de metila
DGEA: peptídeo	Mn e Mw: massas molares
DMAEMA: metacrilato de dimetilamino etila	MTT: brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium
DMAP: dimetilaminopiridina	NaOH: hidróxido de sódio
DMAP: dimetilaminopiridina	NaHCO ₃ : bicarbonato de sódio
DMEM: Dulbecco's modified eagle médium	Na ₂ SO ₄ : sulfato de sódio
DMSO: dimetilsulfóxido	NC: nanocápsula
DNA = ácido desoxirribonucléico	NHS = N-hidroxisuccinimida
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético	NP = nanopartícula
ELISA: enzyme linked immunosorbent assay	PCL: poli-ε-caprolactona
EPR = efeito de permeação e retenção	PCL-P(MMA-DMAEMA) ₂ : copolímero
FmocAsp(OtBu)OH: ácido aspártico com grupamentos de proteção	PCL-P(MMA-DMAEMA-IEM-LD(OMe)V(OMe): copolímero funcionalizado por LDV
FmocAsp(OtBu)Val(OMe): dipeptídeo ácido aspártico-valina com grupamentos de proteção	PDI = índice de polidispersão
FmocLeuOH: leucina com grupamento Fmoc de proteção do grupo amínico	PEG: polietilenoglicol
FDA = Food and Drug Administration	PEO: polioxidoetileno
GPC: cromatografia em permeação de gel	Pgp: glicoproteína P
HCl: ácido clorídrico	PHSRN: peptídeo
HEMA = metacrilato de hidroxietila	PLGA: poli-ácido láctico-co-glicolítico
HUVEC: células de cordão umbilical	PMMA = poli-metacrilato de metila
IC ₅₀ : concentração inibitória de 50% de crescimento celular	PDMAEMA: poli-metacrilato de dimetilamino etila
IEM: metacrilato de 2-isocianato de etila	PMDETA: N,N,N',N',N-pentametildietilenotriamina
IR: índice de refração	RES: sistema retículo endotelial
IV ou IR-FT ou FT-IR: infravermelho – transformada de Fourier	RFB4: anticorpo monoclonal
	RGD: arginina-glicina-ácido aspártico
	RMN ¹ H ou ¹³ C: ressonância magnética nuclear de hidrogênio ou de carbono

Span 60[®]: monoelato de sorbitano 6
SM: solução-mãe
T1: após tratamento 1
T2: após tratamento 2
TCC: triglicérides de cadeia média de ácidos
cáprico e caprílico

TEA: trietilamina
TFA: ácido trifluoracético
THF: tetrahidrofurano
Tween 80[®]: polissorbato 80
VLA-4, VLA-5: integrinas

SUMÁRIO

Conteúdo

INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS GERAIS.....	25
CAPÍTULO 1: Síntese do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ e sua funcionalização com o tripeptídeo LDV.....	27
INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO 1.....	27
2. REVISÃO DE LITERATURA DO CAPÍTULO 1.....	33
3. METODOLOGIA DO CAPÍTULO 1.....	43
4 RESULTADOS DO CAPÍTULO 1.....	57
5. DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 1.....	91
6. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 1.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
CAPÍTULO 2: Nanopartículas de PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ pH-responsivas contendo doxorrubicina: avaliação da eficácia e segurança biológica <i>in vitro</i>.....	111
INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO 2.....	111
9 REVISÃO DE LITERATURA DO CAPÍTULO 2.....	115
10 METODOLOGIA. DO CAPÍTULO 2.....	121
11 RESULTADOS. DO CAPÍTULO 2.....	131
12. DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 2.....	155
13 CONCLUSÕES. DO CAPÍTULO 2.....	163
14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
15. DISCUSSÃO GERAL.....	173
16. CONCLUSÃO GERAL.....	175
17. ANEXOS.....	177

INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela proliferação descontrolada de células, decorrente de alterações no ácido desoxirribonucléico (DNA). Os predominantes são os cânceres de mama (segundo mais incidente), próstata (sexto mais incidente) e pele melanoma (4% é maligno) (BRASIL, 2009; 2012).

Frente ao câncer, os leucócitos migram ao local do tumor, liberando citocinas, tornando a região semelhante a um processo inflamatório (com pH ácido). Os leucócitos ligam-se, por intermédio de seus receptores de superfície (integrinas), às moléculas de adesão expressas por células endoteliais e às substâncias presentes na matriz extracelular. As integrinas são glicoproteínas transmembranares que formam heterodímeros ($\alpha_x\beta_y$) dependentes da presença de cátions divalentes para exercer a ligação entre células e moléculas de adesão ou entre as células e componentes da matriz extracelular e, efetuar a adesão celular (Figura 1) (TAKADA, 2007).

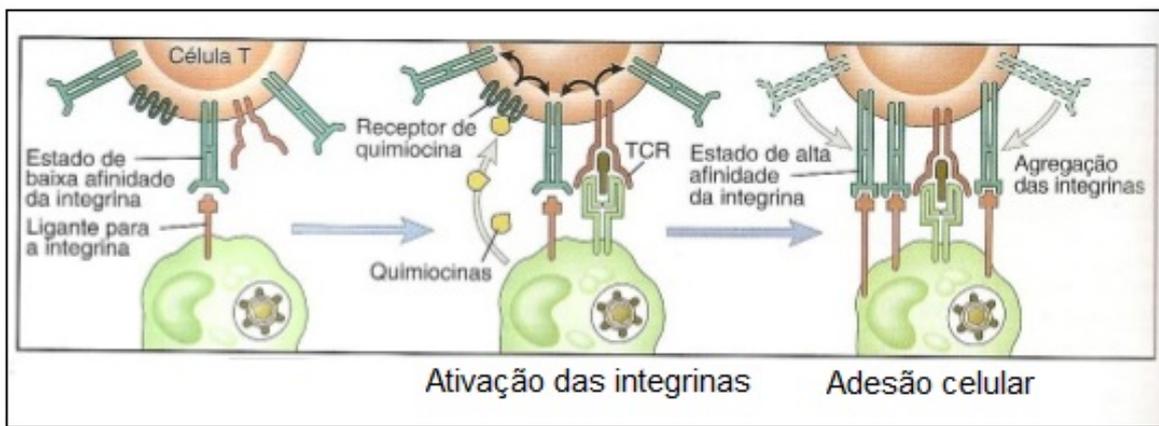


Figura 1. Ativação das integrinas por citocinas e adesão entre células (Portela, 2014).

As moléculas de adesão e as substâncias da matriz extracelular contêm peptídeos os quais apresentam especificidade de ligação com certas integrinas e assim, modulam processos celulares de proliferação, diferenciação e migração celulares e permitem a reconstituição da matriz e o reparo tecidual (TAKADA, 2007; BRASIL, 2002; ANJOS, 2000; ZHANG, 1995). Entretanto, quando o sistema imune é

ineficaz, as células cancerígenas se proliferam podendo ocasionar metástase e morte.

Quando o câncer está instalado, é necessário fazer uso de terapias convencionais (radioterapia, quimioterapia e cirurgia) que embora melhorem o quadro geral do paciente, apresentam efeitos colaterais e ainda, uma boa porcentagem dos cânceres prevalece. Após a prostatectomia e radioterapia, 25-50% dos pacientes tratados para câncer de próstata sofrem recorrência e 40% dos pacientes com câncer de mama sucumbem à doença (DENARDO, 2007; DUBOIS, 2006). Logo, novas terapias alvo se fazem necessárias, como algumas propostas inovadoras nanotecnológicas envolvendo complexos, lipossomas e nanopartículas (ZHONG, 2009; GARG, 2009; DANHIER, 2009; RYPPA, 2008; XIONG, 2005; KUROHANE, 2000; BIBBY, 2005).

Dentre os produtos nanotecnológicos aplicados ao tratamento do câncer, temos o injetável Doxil[®], sob a forma de lipossomas, cujo fármaco é a doxorubicina (Figura 2).

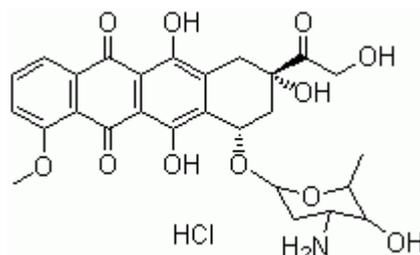


Figura 2. Estrutura molecular do cloridrato de doxorubicina.

A doxorubicina será empregada como fármaco modelo, devido a sua ampla abrangência sobre diferentes cânceres e citotoxicidade frente a metástases, pois inibe a DNA-girase, interage com a topoisomerase II e intercala-se com bases nitrogenadas citocina-guanina, alterando a transcrição de genes (ALMEIDA, 2005; NASCIMENTO, 2005; ALVES, 2003). O dano causado ao DNA ocorre predominantemente em fase G2 do ciclo celular e, os mecanismos citotóxicos incluem a indução de quebras na dupla hélice do DNA, interferência sobre o desenrolamento do DNA, indução da diferenciação e a geração de radicais livres (tipo semiquinona e antraciclina), alterando a membrana celular (NEVILLE-WEBBE, 2005). A doxorubicina causa a morte celular por três diferentes mecanismos: senescência (ativa proteína p53, aumenta a expressão da proteína p21/WAF1,

estando associada à β -galactosidade), apoptose (ativa a proteína p53/Faz/Caspase-8, Caspase-9 e Caspase-3, levando à fragmentação do DNA e morte celular) e necrose (aumenta a fosforilação da Akt, descondensando a cromatina nuclear e lisando a membrana celular), sendo dependentes da concentração, respectivamente (REBBAA, 2003; YANG, 2001).

Seu principal metabólito, o doxorubicinol, possui atividade antineoplásica além de acarretar em estresse oxidativo ao músculo cardíaco (cardiotoxicidade), peroxidação lipídica e oxidação do DNA (JAIN, 2011). É recomendado não mais que 550 mg/m² como dose máxima acumulada (VON HOFF, 1979). Além da cardiotoxicidade crônica, a doxorubicina ainda causa depressão de medula óssea e distúrbios gastrintestinais (VERDUN, 1990). Estes efeitos podem ser reduzidos quando a doxorubicina é encapsulada em sistemas carreadores nanoparticulados (ALKHATIB, 2013; JAIN, 2011; VERDUN, 1990).

Desta forma, visando à redução de efeitos colaterais e a busca de uma alternativa terapêutica inovadora para a vetorização de antineoplásicos pretende-se desenvolver um nanocarreador pH-responsivo.

Considerando que a doxorubicina apresenta um coeficiente de distribuição (Log D) de 1,23 em pH = 7,5 (Software ACDLab), pressupõe-se que em nanocápsulas, esta apresente uma distribuição do tipo II ou III, uma vez que a melatonina (Log D = 0,96) foi classificada por Oliveira et al (2013) como tipo II.

Alguns polímeros metacrílicos têm sido empregados no desenvolvimento de sistemas nanocarreadores para o tratamento de câncer, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Polímeros metacrílicos empregados em carreadores para o tratamento do câncer.

Partícula	Polímero	Fármaco	Publicação
NP	P(ácido-co-metil-metacrílico)	cisplatina	Lee, 2013
Micelas	P(HEMA)-p-(His)	doxorrubicina	Johnson, 2012
NC	Blenda PCL/PMMA-b-PDMAEMA	melatonina	Penott-Chang, 2012
NP	DMAEMA/HEMA	paclitaxel	Malam, 2011
NC	PCL-g-PDMAEMA	Paclitaxel/DNA	Guo, 2010
NP	P(IEM-MMA)	-	Beck, 2009
Micelas	PDMAEMA-b-PCL-b-PDMAEMA	clorambucil	Miguel, 2008
L	PMMA-b-PDMAEMA	-	Cuccovia, 2013a,b

*NP = nanopartículas, NC = nanocápsulas, L = lipossomas.

Destes, ressaltam-se as características individuais da PCL (formador de ligações com outros polímeros e auxiliar de aumento de permeabilidade), MMA (facilitador da propagação de monômeros), DMAEMA (temperatura e pH-responsivo) e IEM (propriedades adesivas e auxiliador de penetração celular). Apesar de ser relatado o uso de blenda de PCL/PMMA-b-PDMAEMA, ainda não há relatos do copolímero contendo PCL, MMA e DMAEMA.

As nanocápsulas pH-responsivas carreadoras de doxorrubicina a serem desenvolvidas neste estudo serão empregadas para o tratamento de tumores podendo agir por efeito de permeação e retenção (EPR) ou, ainda, se funcionalizadas com o tripeptídeo leucina-ácido aspártico-valina (LDV), terão especificidade de ligação pelas integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ e $\alpha_5\beta_1$, visando a vetorização ativa de forma segura e eficaz (Figura 3).

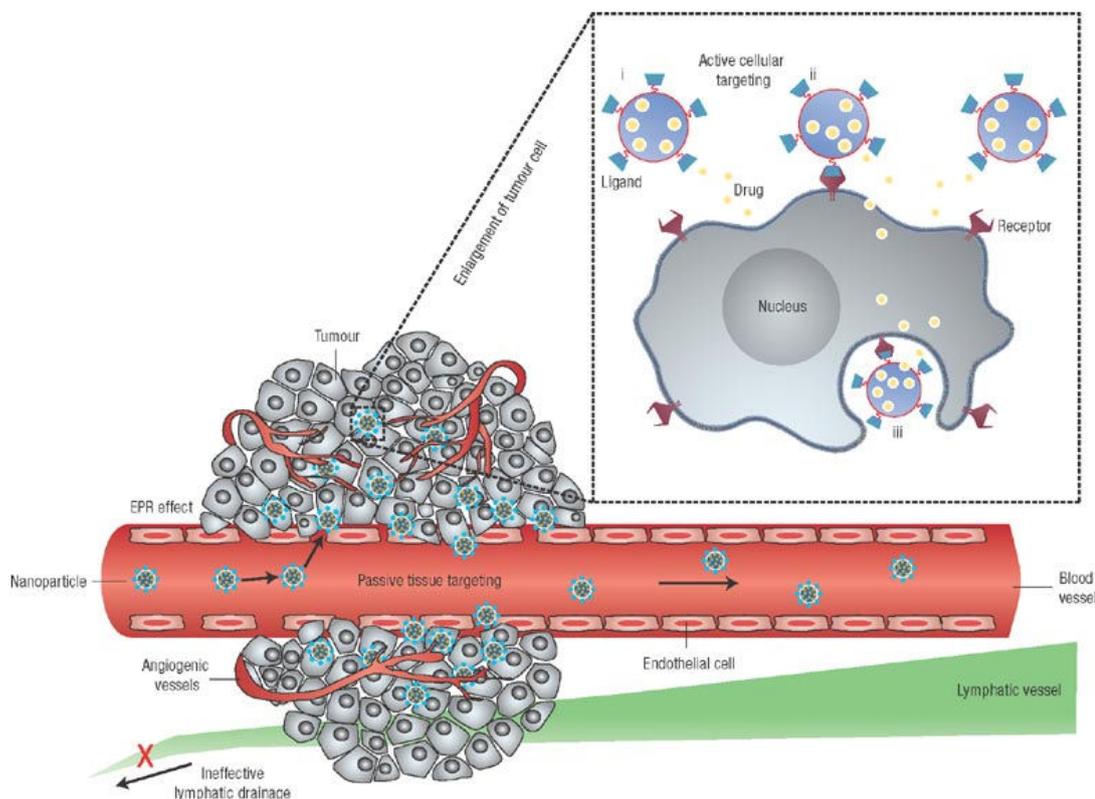


Figura 3. Representação do efeito dos nanocarreadores sobre tumores (EPR e vetorização ativa).

Considerando as possibilidades de interação do LDV à integrinas, sabe-se que a integrina $\alpha_4\beta_1$ encontra-se em leucócitos, células B e T, *Natural Killer*, fibroblastos e células vasculares de músculo esquelético e liso; a integrina $\alpha_4\beta_7$ por sua vez, encontra-se em linfócitos T de memória e em algumas doenças (por exemplo: Crohn, colite ulcerativa e esclerose múltipla) e a integrina $\alpha_5\beta_1$ é expressa em células endoteliais. Ainda, estas três integrinas também estão presentes em células tumorais (TAKADA, 2007; WAITKUS-EDWARDS, 2002; UGAROVA, 1996).

Logo, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo doxorrubicina com parede de poli(ϵ -caprolactona) e superfície recoberta por polissorbato 80 (Tween[®] 80) serão preparadas na presença do copolímero em bloco PCL-P(MMA-DMAEMA)₂, podendo conter um espaçador (PCL-P(MMA-DMAEMA-IEM-LDV)₂) para vetorização ativa de fármacos em integrinas. O DMAEMA é um metacrilato que possui um grupamento amina capaz de responder ao pH do meio, sendo que em pH fisiológico apresenta-se na forma básica, com a porção acrílica enovelada, enquanto que em pH < 7 (tecido inflamado ou tumoral: pH = 5,5 a 7,0) o grupo amino é protonado e a porção

acrílica é estendida, expondo o segmento LDV apenas no sítio de ação e, ao mesmo tempo, protegendo-o contra degradação na circulação (Figura 4).

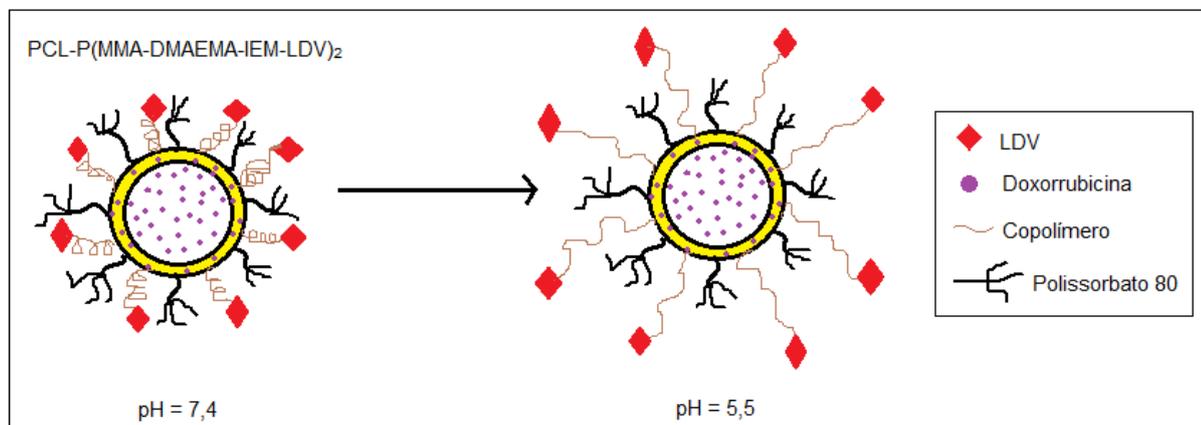


Figura 4. Comportamento das nanocápsulas de PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ em diferentes pHs.

A cobertura da nanocápsula com polissorbato 80 visa proteger o tripeptídeo, evitando sua hidrólise ou fagocitose prévia, sendo sua exposição dependente do pH do meio. O LDV terá facilidade de ser reconhecido pelas células do sistema imune e cancerígenas, concentradas na região do tumor, sendo permitida sua interação com integrinas. Após esta ligação, espera-se que o fármaco seja liberado de forma pronunciada atacando o tumor rapidamente sem lesar as células vizinhas e os fragmentos do nanovetor sejam eliminados do organismo sem causar acúmulo e toxicidade.

Esta pesquisa possui extrema relevância na terapia contra o câncer, pois o nanodispositivo proposto visa controlar o câncer em estágios iniciais e terminais da doença (metástase), devido a sua capacidade de complexar-se com as integrinas que, de maneira geral, possuem uma expressão aumentada nesses estágios, considerando linhagens cancerígenas de mama e próstata (que possuem a mesma origem genética – genes BRCA 1 e 2 e proteína p53) e de pele melanoma (ZHONG, 2009, GLINSKY, 2007, PENG, 2006, FELDING-HABERMANN, 2004, KULBE, 2004, AOUDJIT, 2001, FORNARO, 2001, BERRY, 2000, KIM, 2000, SEFTOR, 1999, GUI, 1995).

Este novo nanocarreador poderá ser empregado para diversos tipos de câncer, considerando a expressão dessas integrinas em outras linhagens celulares; para a inibição da angiogênese, tratamento de doenças cardíacas e vasculares de

músculo esquelético e liso e possivelmente, contra o vírus da AIDS devido à presença em linfócitos T de memória e atuação em macrófagos locais. Em vista dessas perspectivas, este estudo colabora com o desenvolvimento de novas tecnologias de vetorização ativa de fármacos e alternativas de associações moleculares.

2. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico a partir do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂, além de funcionalizar com o tripeptídeo leucina-ácido aspártico-valina (LDV), para a vetorização de um antineoplásico (doxorubicina) às células cancerígenas de mama. A sequência de etapas do estudo é representada na forma de esquema, conforme Figura 5.

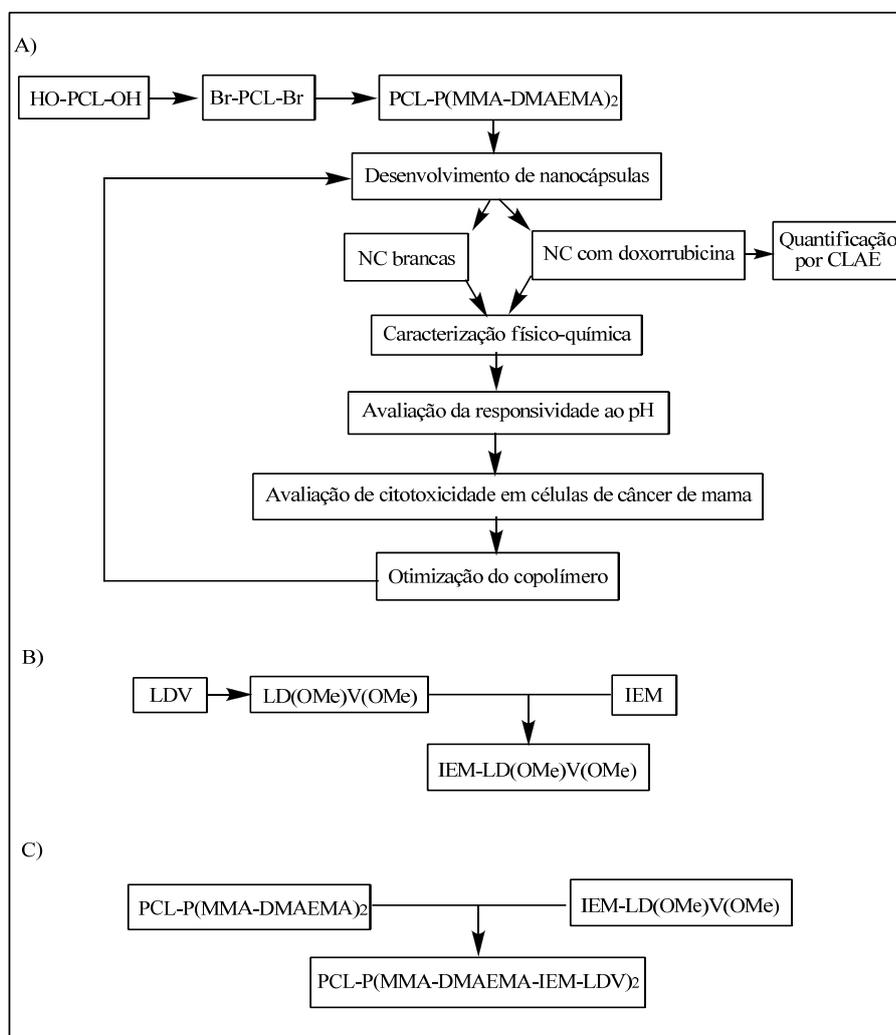


Figura 5. Etapas de desenvolvimento do estudo.

CAPÍTULO 1: Síntese do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ e sua funcionalização com o tripeptídeo LDV

INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO 1

A ciência de polímeros tem dado grande atenção às novas arquiteturas moleculares como copolímeros. Os copolímeros apresentam uma química específica e propriedades físicas diferenciadas e, permitem a modificação de suas extremidades ou ramificações, visando à vetorização ativa. Os copolímeros compostos de diferentes monômeros possuem potencial aplicação em sistemas de liberação de fármacos, biomateriais e nanotecnologia (DARCOS, 2011).

A síntese de copolímeros pode ser realizada por diferentes métodos de polimerização controlada viva, como a técnica de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP). A ATRP é uma técnica simples e acessível de polimerização resultando em polímeros com terminação funcionalizada por halogênios. Ocorre por reação de substituição envolvendo inicialmente o emprego de complexo metálico em estado *bulk*, solução orgânica, água como solvente ou em emulsão (DARCOS, 2011; GAO, 2006; SUMERLIN, 2005; SHEN, 2004; ZENG, 2000).

A ATRP possui uma derivação conhecida por ATRP-ARGET, ou seja, polimerização por transferência eletrônica por regeneração de ativadores, a qual utiliza cobre (I)-halogênio/ligante e monômero, com a presença ou não de um redutor (DONG, 2008). Essa técnica é uma alternativa de custo mais acessível e simples que a ATRP convencional para a obtenção de polímeros em bloco.

Os polímeros que são muito empregados para o desenvolvimento de novas arquiteturas e sistemas de liberação de fármacos incluem poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli[metacrilato de 2-(*N,N*-dimetilamino)etila]

(PDMAEMA) e poli[metacrilato de metila] (PMMA) (DARCOS, 2011; DONG, 2010; RIMESSI, 2009; BOUGARD, 2007; CAMPOS, 2003; ARAUJO, 1999).

A PCL é um poliéster alifático sintético, insolúvel em água, biocompatível, atóxico e biodegradável, cujo ponto de fusão é relativamente baixo (60°C) e torna-se atrativo o seu emprego devido a capacidade de formar ligações compatíveis com vários outros polímeros (BOUGARD, 2007; CAMPOS, 2003). Ainda, a PCL possui baixa imunogenicidade e é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (MIGUEL, 2008).

O PDMAEMA é um polímero biocompatível, hidrofílico, atóxico, sensível ao pH e a temperatura, descrito como polibase fraca. Possui pKa de 7,4 e temperatura de solução crítica inferior (LCST) de 50°C em água. Apresenta solubilidade em água por meio da protonação de seus grupos amino terciários com pH < 7,0, como ocorre no local de presença de tumores. A nanopartícula constituída deste polímero irá se dissociar e liberar o fármaco, concomitante à expansão do PDMAEMA (DONG, 2010; MIGUEL, 2008; BOUGARD, 2007; XU, 2006; BAINES, 1996).

O PMMA é, por sua vez, um polímero biocompatível, hidrofóbico e que possui baixa toxicidade, sendo empregado como facilitador da propagação de monômeros durante a polimerização (BAINES, 1996).

Com base nas características individuais desses polímeros, o objetivo deste trabalho foi sintetizar um copolímero em bloco utilizando PCL e DMAEMA (e/ou MMA) por ATRP ou ATRP-ARGET. Esse copolímero será aplicado no desenvolvimento de nanopartículas pH-responsivas contendo um antineoplásico (doxorrubicina) e, que poderá ser funcionalizada com o tripeptídeo LDV objetivando a vetorização ativa por interação com integrinas.

Os peptídeos são aminoácidos unidos por ligações peptídicas (amida) que compõe proteínas biológicas. Eles possuem a função de reconhecimento celular e controle de processos como adesão, regulação (proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose), motilidade/migração e sinalização celular. Ainda, agem na identificação de sítios biológicos ativos e na transdução de sinais celulares como fluxo iônico e ativação de cascatas enzimáticas (MIN, 2004). Também podem atuar como catalisadores ou quelantes de metais (MACHADO, 2004; PATEL, 1965; SPRINGER, 1963).

Conforme já mencionado, os peptídeos interagem com as integrinas das células. As integrinas são receptores de superfície celular sob a forma de heterodímeros transmembranares ($\alpha\beta$). Em humanos existem 18 subunidades α e 8 β , gerando 24 heterodímeros responsáveis por modular o reconhecimento celular por interações entre célula-célula (homotípica), célula-proteína de matriz extracelular, célula-ligante solúvel e célula-moléculas de adesão celular (heterotípicas) (TAKADA, 2007; ANJOS, 2000; RUOSLAHTI, 1996; ZHANG, 1995). A modulação de reconhecimento celular envolve a unidade α que contém um ou mais sítios de ligação e a unidade β que é dependente de cátions divalentes, como cálcio ou magnésio. Juntas, conectam o meio extracelular aos microfilamentos de actina do citoesqueleto (JIA, 2004. TAKADA, 2007; RUOSLAHTI, 1996).

A expressão das integrinas é modulada por citocinas, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular em diferentes ambientes teciduais (HOFFMANN, 2005). De forma geral, as integrinas apresentam expressão aumentada no início do desenvolvimento de tumores e nos estágios finais do câncer (metástases) (GLINSKY, 2007; KULBE, 2004; FORNARO, 2001; BERRY, 2000; SEFTOR, 1999; NOORANI, 1999; GUI, 1995).

Logo, existem peptídeos presentes em proteínas de matriz ou em moléculas de adesão que se ligam especificamente com determinadas integrinas expressas em células. Como exemplos da especificidade peptídeo-integrina, tem-se: o peptídeo KQAGDV (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) que se liga as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, KGD (Lys-Gly-Asp) com $\alpha_{IIb}\beta_3$ e DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala) com $\alpha_2\beta_1$. O peptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) pode interagir com 20 diferentes integrinas conhecidas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_7\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, entre outras). Porém, não é específico em termos de atividade (HUHTALA, 1995). Para peptídeos como o RGD, a promoção da adesão celular ocorre quando este se encontra insolúvel na superfície celular (RUOSLAHTI, 1996). O RGD é uma sequência que compõe proteínas como desintegrinas, fibronectina, vitronectina, tromboespontina, osteopontina e fator de Von Willebrand (TSELEPIS, 1997; JOHANSSON, 1997; AKIYAMA, 1995). Ainda, o RGD é citado como sendo um facilitador

para a penetração de bactérias e vírus em células hospedeiras (SCHAFFNER, 2003).

Já a sequência LDV (Leu-Asp-Val), que também se encontra na fibronectina (além do RGD) e em outras moléculas de adesão celular, é capaz de ligar-se de forma mais específica a um menor número de integrinas, sendo elas: $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ (TAKADA, 2007; WAITKUS-EDWARDS, 2002; TSELEPIS, 1997; UGAROVA, 1996). Humphries et al (1995) cita que o LDV é um peptídeo competitivo ao RGD pela ligação com $\alpha_v\beta_3$ quando na fibronectina.

A integrina $\alpha_4\beta_1$ (ou VLA-4) é expressa em leucócitos, linfócitos B, linfócitos T, células tumorais, células *Natural Killer*, fibroblastos e em células vasculares de músculo esquelético e liso e, ainda em endotélio inflamado. A $\alpha_5\beta_1$ (ou VLA-5) é o receptor de células endoteliais entre outras e a $\alpha_4\beta_7$ está presente em linfócitos T de memória. Estas três integrinas estão presentes em tumores como de próstata e mama (TAKADA, 2007; WAITKUS-EDWARDS, 2002; UGAROVA, 1996).

Quando as células se encontram em processo de mitose ou na circulação, as integrinas de superfície encontram-se inativas enquanto que, na presença de um fator, ativam-se para a ligação com peptídeos e adesão celular (JOHANSSON, 1997).

Por meio do estudo de Jia et al (2004), foi concluído que a regulação controlada da expressão da integrina $\alpha_4\beta_1$ durante o desenvolvimento do processo oncogênico é capaz de reprimir a ocorrência de metástase de células epiteliais mamárias. Essa repressão ocorre após a interação da integrina $\alpha_5\beta_1$ com a sequência peptídica Ac-PHSRN-NH₂ (Pro-His-Ser-Arg-Asn) presente no domínio central da fibronectina (sequência aditiva ao RGD para adesão celular). Comprovou-se ainda que o LDV, em concentração equimolar, inibe a invasão de células tumorais, impedindo a ocorrência de metástase. Logo, a presença de peptídeos, bem como, a expressão das integrinas são fatores determinantes na adesão celular e na invasão tecidual do câncer.

Com base na localização dessas integrinas em células específicas surge a hipótese de veicular o LDV como agente de vetorização ativa para

fins como: tratamento de diversos tipos de câncer, inibição da angiogênese, tratamento de doenças cardíacas e, possivelmente, contra o vírus da AIDS.

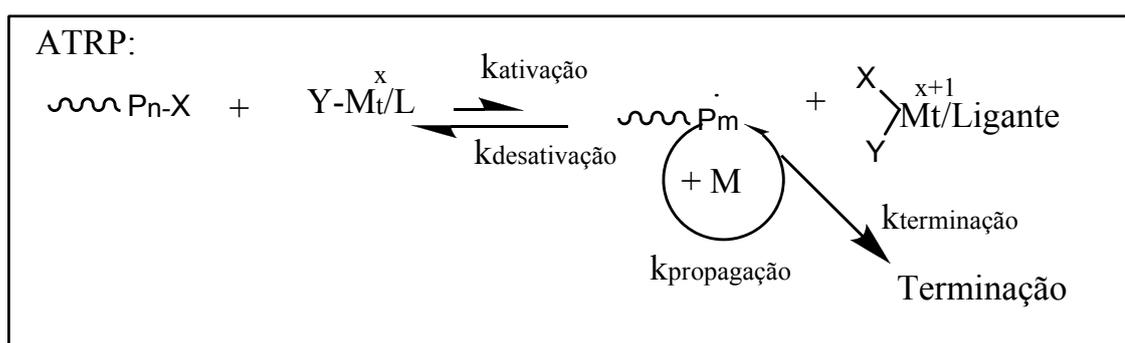
Para tanto, vem sendo utilizadas estratégias de vetorização empregando peptídeos ligados a polímeros biodegradáveis (PATEL, 2012; SHAKAYA, 2010), a antineoplásicos (RYPPA, 2008; ZHONG, 2009) e, em carreadores como lipossomas (XIONG, 2005) ou nanopartículas (DANHIER, 2009; BIBBY, 2005).

Assim, o estudo da ligação do LDV com o copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ se faz necessário para possibilitar o emprego deste material na preparação de nanocápsulas poliméricas, visando à vetorização ativa no tratamento de neoplasias.

2. REVISÃO DE LITERATURA DO CAPÍTULO 1

A síntese de copolímero em bloco pode ser realizada por diferentes métodos de polimerização controlada viva, como a técnica de polimerização controlada por ATRP que é uma das técnicas mais comumente empregadas (ZHENG, 2003). Nela, ocorre um equilíbrio dinâmico rápido entre o crescimento de radicais livres e espécies dormentes (iniciador). O iniciador é ativado a radical para a propagação de monômeros por reação catalítica. A ATRP utiliza complexos de metais de transição solúveis como catalisadores na reação redox, sendo os mais comuns baseados em brometo de cobre (I) ou rutênio (II), os quais exigem o uso de um ligante (ex. para cobre, geralmente bipyridina ou amina multidentada) (SHEN, 2004).

O complexo metálico formado (CuBr/ligante) sofre a oxidação de um elétron com redução homolítica simultânea do átomo de halogênio da espécie dormente gerando um radical (Polímero_n-X). O radical propaga os monômeros (Monômero: M) sendo desativado junto ao complexo metálico para seu estado dormente, ligado à cadeia polimérica com o haleto na terminação e, regenera o metal de transição inicial, processos que são apresentados no Esquema 1.



Esquema 1. Reações por ATRP (SHEN, 2004).

Essa reação repete-se até total consumo do monômero. A constante de desativação é superior ao da ativação e, cada cadeia polimérica é protegida por passar a maior parte do tempo como espécie dormente e, a terminação permanente por acoplamento radicalar é minimizada (SHEN, 2004; MONTALA-TIMOL, 2007a).

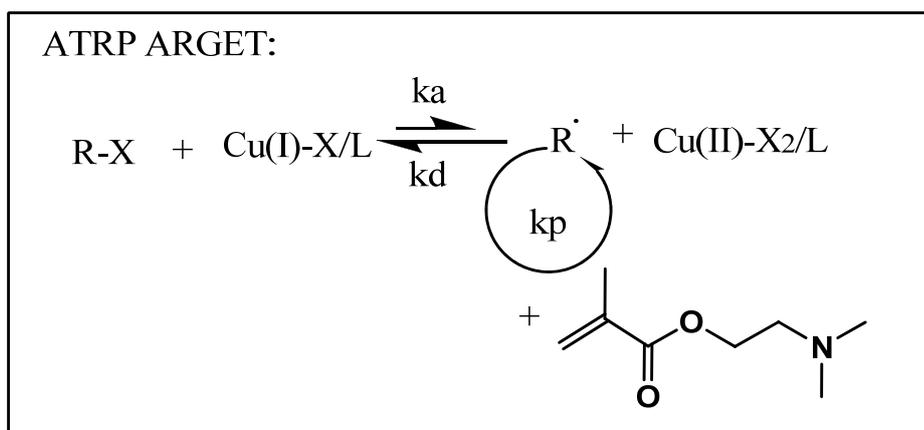
Considerando o emprego da ATRP para a copolimerização de PCL com monômeros DMAEMA (contendo ou não MMA), algumas observações são necessárias para a execução da técnica, como (SHEN, 2004):

- a massa molecular final do polímero pode ser ajustada. Observa-se a distribuição de massas moleculares entre 1,0 e 1,5 (PDI) (PATTEN e MATYJASZEWSKI, 1999). As razões molares [monômero]/[iniciador] empregadas variam de 98:2 (MONTALA-TIMOL, 2007b), 100:1 (MONTALA-TIMOL, 2007a) e 40:1 (ZHU, 2010).
- o uso de pequena quantidade de catalisador aumenta a eficiência do iniciador, logo, preconiza-se uma relação [iniciador]/[CuBr] \leq 0,5 molar (JIANG, 2010).
- polimerizações em temperaturas mais brandas resultam em pequenas concentrações de radicais e maiores tempos de polimerização. As temperaturas podem variar de -20°C a 130°C (PATTEN e MATYJASZEWSKI, 1999).
- um pequeno grau de tolerância para a presença de oxigênio na reação pode ser desconsiderado uma vez que este se complexa com metais de valência zero (PATTEN e MATYJASZEWSKI, 1999).
- o catalisador cobre sofre precipitação junto ao polímero, o que colore o produto. O cobre apresenta toxicidade intermediária entre ferro (menos tóxico) e níquel ou paládio (mais tóxicos) e, pode acumular-se no organismo e interagir com enzimas e outras moléculas de importância biológica ou ainda, participar de reações do tipo redox (TSAREVSKI, 2007). Para o conjunto PMMA/CuBr/bipiridina ocorre coloração marrom enquanto para PMMA/CuBr/amina alifática ocorre a coloração verde escuro, como é o caso com uso de N,N,N',N',N-pentametildietilenotriamina (PMDETA). Logo, o resíduo de catalisador deve ser eliminado para a maioria das aplicações, melhorando o aspecto estético bem como a segurança.
- a escolha do ligante também influencia no controle da polimerização por ATRP, sendo citado que o PMDETA é um melhor complexo redutor com brometo de cobre que o tris[2-(dimetilamino)etil]amina (CuBr/Me₆TREN) (SHEN, 2004; HONG, 2003).
- a purificação para a retirada do cobre residual no polímero pode se dar por diferentes metodologias como lavagem (ex. dissolução-precipitação do PMMA em meio polar: o polímero precipita e o catalisador permanece em solução, uma vez que cobre (II) é solúvel em meio polar) ou extração (em solução aquosa contendo quelante como ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), embora seja necessário o ajuste do pH para ácido). Ainda, pode-se empregar a filtração por colunas de alumina (neutra para PMMA e básica para PDMAEMA) ou sílica gel 60. Complexos

de cobre possuem alta afinidade por esses materiais devido à formação de ligações de hidrogênio com os grupamentos Al-OH e Si-OH, respectivamente (JIANG, 2010; SUN, 2008; BOUGARD, 2007; BORMAN, 2000).

A ATRP apresenta uma derivação, a técnica de polimerização ATRP-ARGET, regeneração de ativadores por transferência de elétrons, a qual utiliza um iniciador, cobre (I)-halogênio/ligante e monômero. É possível utilizar ou não um agente redutor, uma vez que compostos com nitrogênio como o monômero DMAEMA ou ligante PMDETA podem atuar como redutores, devendo apresentar-se em quantidade superior que ao de brometo de cobre (I) (DONG, 2008).

Na ATRP-ARGET o cobre (I) é oxidado a cobre (II) e o cobre (II) é reduzido a cobre (I) em presença do redutor, logo o catalisador é regenerado por transferência de elétrons. Além deste papel, o agente redutor é capaz de consumir pequenas quantidades de oxigênio do ambiente reacional. O esquema da reação é apresentado a seguir (Esquema 2).



Esquema 2. Reação por ATRP-ARGET (DONG, 2008).

Na ATRP-ARGET a quantidade de cobre (I) pode ser reduzida a 10^3 vezes em relação à ATRP convencional (2.000-10.000 ppm) (menor custo). Ela tolera um excesso do redutor, o que elimina a necessidade de retirada de oxigênio do sistema, simplificando a técnica ATRP e, eliminando a etapa de purificação do cobre (DONG, 2008; TANG, 2008).

A ATRP-ARGET preserva as funcionalidades terminais de cadeia evitando reações laterais entre os radicais de propagação e o catalisador cobre, permitindo obter um polímero de alta massa molecular com estreita distribuição (KWAK, 2011;

2009). A maioria da literatura cita a necessidade de temperaturas altas (80-90°C), embora outros autores a façam a 25-30°C e, como desvantagem, há a necessidade de maior tempo de reação variando de 3h a 24h (KWAK, 2011; NICOLAÏ, 2010; CHAN, 2010; KWAK, 2009; KWAK, 2008; MIN, 2007; OH, 2006).

A partir desses estudos e do conhecimento das técnicas e materiais pode-se sintetizar um bloco polimérico composto por PCL e DMAEMA, contendo ou não MMA, o qual poderá ser empregado para o preparo de nanopartículas responsivas ao pH do meio biológico.

Visando a modificação de grupamentos químicos, a construção de novos blocos e a obtenção de sistemas inovadores de liberação de fármacos, alguns polímeros que se encontram em estudos são a PCL, DMAEMA e o MMA.

Normalmente a PCL empregada na síntese de copolímeros apresenta-se com baixa massa molecular conforme já visto no trabalho de Miguel et al (2008). O copolímero de PDMAEMA-PCL-PDMAEMA foi sintetizado partindo de um macroiniciador (PCL ($M_n = 2000$ g/mol)) com extremidades bromadas por brometo de 2-bromoisobutirila e seguido do emprego da ATRP, obtendo o copolímero para a formação de micelas carreadoras de clorambucil (antitumoral). Arslan (1999) utilizou PCL ($M_w = 1250$ g/mol) polimerizada com MMA, em duas etapas, formando os copolímeros PMMA-b-PCL e, PMMA-b-PCL-b-PMMA, visando o aumento de rendimento por uso de ácido nítrico e iniciação por íons cério.

Já a PCL com maior massa molecular ($M_n = 24000$ g/mol e $M_n = 45000$ g/mol) foi polimerizada por ATRP em suspensão com PMMA formando polímero em estrela ou blendas, respectivamente (MÉNDEZ, 2002; HEISE, 2001). Para ambos foram necessários duas ou mais etapas de polimerização. A blenda ainda recebeu a incorporação de cloridrato de vancomicina (antibiótico glicopeptídico), sendo avaliada quanto à liberação *in vitro* (MÉNDEZ, 2002). Observa-se que nesses casos a técnica de polimerização envolve geralmente, a ATRP em combinação com outra técnica de polimerização viva.

Uma vez obtido o copolímero, este pode ainda ser funcionalizado com peptídeos, como o LDV, possibilitando seu emprego na preparação de nanocápsulas de vetorização ativa.

O LDV pode ser obtido de forma sintética ou adquirido comercialmente. A síntese peptídica pode ser realizada em meio líquido, chamada síntese em solução ou, em fase sólida utilizando um aminoácido ligado a um suporte polimérico.

A síntese de peptídeos em solução necessita de etapas intermediárias de tratamento reacional, incluindo purificação, proteção e desproteção de grupamentos de extremidade ou cadeia lateral, tornando-se mais trabalhosa (MACHADO, 2004).

Já, a síntese em fase sólida é a mais empregada para obter peptídeos devido à praticidade, rapidez, possibilidade de automação e permite a síntese individual, paralela e múltipla (MACHADO, 2004; SAKIKABARA, 1999).

Existem diversas estratégias de acoplamento de peptídeos que vem sendo empregadas nas pesquisas científicas para o tratamento de câncer. Dentre elas tem-se a conjugação de peptídeos com:

- ◆ Radioisótopos: O $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -pirazoil foi conjugado com o peptídeo RGD-D-Tyr-Lys vetorizando à integrinas vasculares de células M21 de melanoma humano (ALVES, 2007).

- ◆ Anticorpos: O anticorpo monoclonal RFB4 foi ligado, via maleimida, à toxina ricina de cadeia A (RTA) e esta ao peptídeo LDV, sendo avaliado o dano às células de endotélio vascular (em células HUVEC, endoteliais de cordão umbilical) e a ocorrência de rupturas vasculares. Foi comprovado que o LDV derivado de RTA induz prematuramente a apoptose em células HUVEC por meio da indução de caspase-3 e, a presença do ácido aspártico foi crucial para a ligação RFB4-RTA-LDV às células HUVEC e na ocorrência de dano celular. O ácido aspártico se encontra parcialmente exposto ao RTA enquanto que a leucina e valina permanecem não sendo expostas. E, infere-se que as mutações no ácido aspártico podendo prevenir a ligação ao RTA e o dano às células HUVEC (BALUNA, 2000).

- ◆ Antineoplásicos: A doxorrubicina foi ligada, via maleimida, à RGD divalente ($\text{E}[\text{c}(\text{RGDfK})_2]$) e analisada quanto a interação com integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ em câncer de ovário *in vitro* e *in vivo* (RYPPA, 2008).

Outros exemplos de ligações entre antineoplásicos e peptídeos encontram-se na ligação de metotrexato via ácido glutâmico ($\text{Glu-}\alpha\text{-OtBu}$) à um octapeptídeo, sendo avaliado quanto à inibição de proliferação celular de câncer de mama, próstata e pâncreas em cultura celular (NAGY, 2003) e de paclitaxel ao ($\text{E}[\text{c}(\text{RGDfK})_2]$) por meio da hidroxisulfonosuccinimida (SNHS) avaliando o tratamento sobre células de câncer de mama (CHEN, 2005).

Em relação a ligações diretamente com o LDV, temos a ligação com o fármaco fluorescente 7-amino-4-carbamoilmetilcoumarina para interagir com $\alpha_4\beta_1$

expressa em tumores, controlando a liberação mediante a hidrólise enzimática. Foi observado que o conjugado resiste às enzimas em tecidos normais e quando em tecidos tumorais (melanoma, células A375), exibiu a liberação do ativo catalisada por enzimas (KOTAMRAJ, 2009). Zhong e colaboradores (2009) empregaram doxorrubicina (2 µg/mL) ligada, via anidrido succínico (NHS), ao LDV para agir como vetor às células de melanoma *in vitro*, demonstrando que sua efetividade é dependente da expressão das integrinas, principalmente de $\alpha_4\beta_1$ em células A375.

◆ Polímeros: O N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico ligado a alanina, glicina ou serina sob forma de mono, di ou tripeptídeos para avaliar a LCST para o futuro uso em carreadores de pró-fármacos (BULMUS, 2001).

Stevens (2014) incorporou RGD à interface de PCL para aplicação em dano de nervos periféricos e Banerjee (2000) testou esferas de PEG-PMMA-PEG contendo RGD em fibroblastos para controle de resposta celular.

◆ Sistemas carreadores: Para os vários sistemas carreadores temos a exemplificação distinta, conforme segue:

- Micelas: Um bioconjugado híbrido de poli-hidroxietil metacrilato de acrílico-poli-histidina (P(HEMA)-p(His)) foi empregado na forma de micelas para carrear doxorrubicina e observar sua liberação em função do pH e a efetividade de resposta frente a células HCT116 de carcinoma de colon. O efeito observado foi dose-dependente e a liberação em pH 5,5 foi em torno de 90%, enquanto em pH 7,4 foi de 60% (JOHNSON, 2012). Micelas de poli(etileno óxido)-b-poli(butadieno) contendo RGD foram estudadas visando o emprego como carreador para vetorização de fármacos (ZUPANCICH, 2009).

- Lipossomas: Em lipossomas revestidos por PEG conjugou-se RGD cíclico e encapsulou-se doxorrubicina, visando à vetorização para tumores devido à interação com integrinas vasculares e, obteve-se uma maior captação dos lipossomas contendo RGD em células de glioma U87MG em comparação aos lipossomas não vetorizados por RGD (CHEN, 2012). Lipossomas contendo RGD mimético e doxorrubicina foram desenvolvidos para comprovar o efeito de permeação e retenção (EPR) em melanomas. A presença do RGD na superfície do lipossoma permitiu atingir uma maior

citotoxicidade em células e, em ratos, obteve-se maior contenção do crescimento do tumor (XION, 2005).

- Quantum dots: Quantum dots semicondutores foram funcionalizados por peptídeos CGGGRGD e CGGGLDV objetivando o estudo de processos subcelulares, uma vez que RGD e LDV possuem afinidade de ligação seletiva à integrinas de neurônios e células de câncer de mama (MDA-MB-435) (BAIRAMOV, 2008; 2007).

- Nanopartículas: Nanopartículas de PLGA (ácido poli(lático-co-glicólico) contendo um octapeptídeo e loperamida foram marcadas com rodamina-123 e avaliadas quanto a biodistribuição em macro-áreas do cérebro. Sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica foi justificada pela presença do peptídeo na superfície da nanopartícula (TOSI, 1997). Também, o paclitaxel foi encapsulado em nanopartículas de PLGA contendo, via ligação PCL-b-PEG, RGD ou RGD peptidomimético. Foi comprovada a vetorização ao tumor endotelial e o aumento da eficácia do fármaco (DANHIER, 2009).

Como exemplos de trabalhos de nanopartículas preparadas a partir de metacrilatos e funcionalizadas por peptídeos, tem-se a pesquisa de Bibby (2005), onde nanopartículas de inulina multi-metacrilato contendo RGD cíclico ligado por meio de PEG-400 encapsularam doxorubicina para avaliação de sua biodistribuição e farmacocinética em ratos. Foi demonstrado que houve um acúmulo do fármaco no fígado, baço e tumor em até 48 horas, com a presença de altas concentrações do metabólito nesses tecidos.

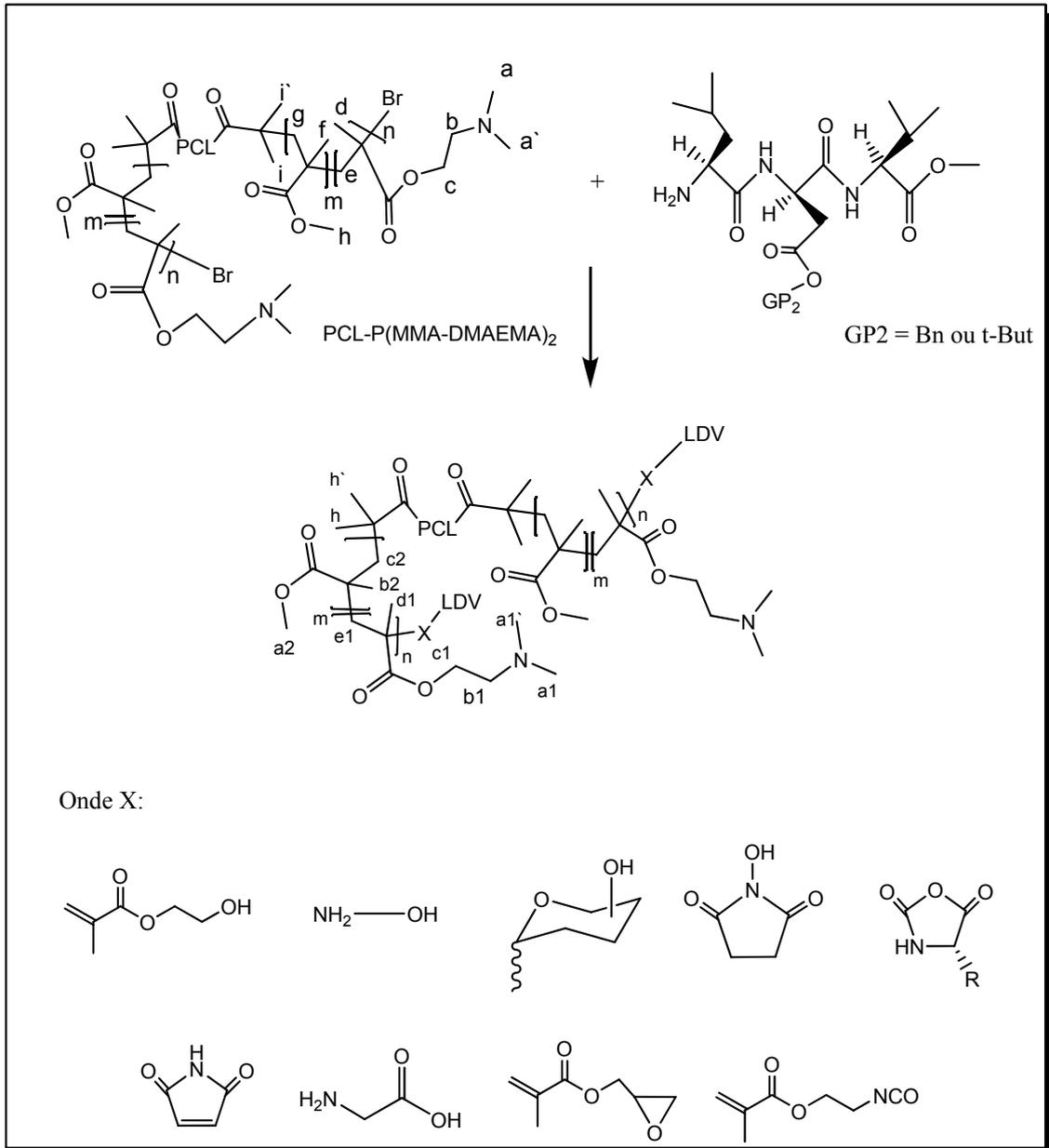
O emprego de LDV em nanopartículas foi citado apenas por Fievez et al (2009), onde nanopartículas de MeO-PLGA-OH (70%)/PEG-b-PLGA (15%)/PEG-PCL (15%) foram preparadas não vetorizadas e vetorizadas com RGD, RGD peptidomimético, LDV derivativo, LDV peptidomimético e manose. Foi avaliada a vetorização à integrina $\beta 1$ expressa na superfície de células intestinais M quanto ao aumento de resposta imune após administração oral. Foi observado que ambos RGDs aumentam o transporte das nanopartículas às células M em comparação com eritrócitos. O RGD, LDVd, LDVp e manose aumentaram a captura das nanopartículas por macrófagos e a produção do anticorpo IgG quando comparados a via intramuscular. Logo, o transporte, a captura e a resposta imune são melhorados quando se utilizam nanopartículas vetorizadas com peptídeos.

Segundo Morell (2013), o emprego de peptídeos conjugados a polímeros é importante devido à capacidade dos peptídeos de adotarem conformações estáveis, se auto-organizarem em nanoestruturas por meio de interações não covalentes e, podem ainda auxiliar na estabilização de interfaces com os biosistemas.

Shlaad et al (2003) citam que bioconjugados polímero-peptídeo gera um material com características de maior solubilidade, elasticidade da porção polimérica, reconhecimento mútuo e, melhor desempenho mecânico e biodegradabilidade.

Com base nos estudos citados, procurou-se efetuar uma investigação sobre os possíveis espaçadores que podem ser empregados na ligação peptídeo-polímero. As estratégias abrangem o uso de polímeros de extremidade modificada como metacrilato de hidroxietila (HEMA), hidroxilamina e sacarídeos (SHAKAYA, 2010), N-hidroxisuccinimida (NHS), α -aminoácidos-N-carboxianidridos (JOHNSON, 2012; NICOLAS, 2007), maleimida (GOUTAYER, 2010; SHAKAYA, 2010), glicina (NICOLAS, 2007) e, outros polímeros como o poli(metacrilato de glicidila) e poli(metacrilato de 2-isocianato de etila) (JONSSON, 2009; AYRES, 2005; 2003).

Conforme o Esquema 3 podem-se observar a substituição a ser realizada com estes diferentes espaçadores.



Esqueva 3. Ligação Copolímero $\text{PCL-P(MMA-DMAEMA)}_2$ com LDV e possíveis espaçadores.

Destes (possíveis espaçadores X), o metacrilato de 2-isocianato de etila (IEM) é um promissor ligante uma vez que permite a formação de ligação uréia (—NH—CO—NH—) com o peptídeo, conforme demonstrado por Ayres (2005; 2003).

O IEM é um polímero muito utilizado para engenharia tecidual devido à suas propriedades adesivas a ossos, dentes e articulações de tecidos moles. Sua ligação química se mantém estável até 7 dias quando em água e/ou temperaturas até 55°C nesses ambientes (BAYRAMOGLU, 2010). Embora o monômero seja tóxico, os materiais poliméricos no qual ele foi inserido (envolvendo conjugação com PCL e

DMAEMA) foram testados frente a plasma humano *in vitro* e administrados pela via subcutânea em ratos. Estes demonstram baixa toxicidade não propiciando a ocorrência de inflamação tecidual ou alterações histológicas em nível significativo (FERREIRA, 2008; WERKMEISTER, 2010).

Quanto a sua biodegradabilidade, o conjugado possui ligações ésteres susceptíveis à hidrólise. Seus fragmentos são metabolizados no ciclo de Krebs e eliminados por via renal (FERREIRA, 2008). Baier et al (2012) citam que Poli(alquil cianoacrilatos) ainda apresentam a propriedade de melhorar a penetração intracelular.

Os trabalhos de Ayres et al (2005, 2003) trazem os procedimentos de síntese da incorporação de uma sequência peptídica predominante da elastina em cadeias poliméricas, pelo emprego do macroiniciador Br-PEG-Br (produzido por ATRP) e a copolimerização com IEM-Val-Pro-Gly-Val-Gly.

Já o emprego do IEM em nanopartículas foi citado por Beck et al (2009), que sintetizou um copolímero P(IEM-MMA) e este foi utilizado no preparo de nanopartículas colapsadas intermolecularmente em condições brandas, atingindo diâmetros de 8 a 20 nm.

Sendo assim, o objetivo do presente capítulo é sintetizar o copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ e funcionalizá-lo, por intermédio do IEM, com o tripeptídeo LDV, para aplicação em nanopartículas carreadoras de antineoplásicos à tumores.

3. METODOLOGIA DO CAPÍTULO 1

3.1. MATERIAIS

A PCL (Mw = 14 kDa, Mn = 10 kDa, código 440752) e, os monômeros metacrilato de metila (MMA 99%, código M55909), metacrilato de 2-dimetilaminoetila (DMAEMA 98%, código 234907) e metacrilato de 2-isocianato de etila (código: 477060), FmocAsp(OtBu)OH (código:47618), FmocLeuOH (código: 47633), diciclohexilureia (DCC – código: D80002), N,N,N',N',N"-pentametildietilenotriamina (PMDETA 99% - código 369497) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP – Merck – código: S24761 911) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. O brometo de 2-bromoisobutirila (98 % - Sigma Aldrich – código 252271), anisol (Fluka), L-valina (Vetec) e BocAsp(OBn)OH (sintetizado) e os demais solventes (p.a) foram usados conforme adquiridos, sendo estes: ciclohexano (Nuclear), tetrahidrofurano (THF - Fmaia) e acetona (Nuclear).

O DMAEMA foi purificado por coluna de alumina básica e o MMA por coluna de sílica gel 60 enquanto que o clorofórmio e diclorometano (Vetec) foram secos com hidreto de cálcio, PMDETA foi destilado e trietilamina (Tedia) foram secos com hidróxido de potássio antes de sua utilização, sendo armazenados em geladeira. O brometo de cobre (I) (CuBr 98%, código 212865, Sigma Aldrich) foi tratado para eliminar resíduos de cobre (II), conforme segue: 10 g de CuBr foram lavados com cinco frações de 25 mL de ácido acético (Fmaia), três frações de 30 mL de álcool etílico absoluto (Fmaia), e seis frações com 15 mL de éter etílico destilado (Fmaia). Após, foi seco e armazenado em geladeira (NICOLAS, 2006). O solvente metanol (Nuclear) foi seco sob magnésio metálico e iodo e o cloreto de tionila (Neon) foi destilado. Para acompanhamento das reações utilizou-se como fase estacionária da cromatografia em camada delgada, uma placa de sílica gel com fluorescente (THL Alumínio). E, o tripeptídeo LDV foi adquirido da GenScript (EUA) com 97% de pureza.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS SINTETIZADOS

Os produtos reacionais foram avaliados por:

- espectrômetro no infravermelho (IV – Varian 640 FT-IR Spectrometer), sendo os espectros obtidos com transformada de Fourier no modo de transmitância, cobrindo a faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} , sendo as amostras realizadas em filmes sob NaCl.

- espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C) (INOVA-300 Varian), tendo clorofórmio deuterado (CDCl_3-d_6) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna (δ 0,0).

- cromatografia de permeação em gel (GPC, GPCMax Tripledetector - Viscotek) conectado a um refratômetro diferencial (Waters 410) com três colunas (Styragel, 10^4 , 10^5 e 10^6 Å). O equipamento foi calibrado com padrões de poliestireno monodisperso e THF foi usado como solvente. A análise por GPC considerou a determinação de massas molares e de polidispersão dos polímeros.

- viscosidade vibracional (RS-Visco SV-10) utilizando cubeta para solvente orgânico, a 22°C, calibrado com água milliQ a 23,6°C (viscosidade_{água} = 0,92 mPa.s).

- refratômetro de Abbe, utilizando clorofórmio como solvente.

Os sinais característicos dos produto em cada análise é exposto de forma completa na metodologia, entretanto, descrito de forma mais breve, salientando as modificações estruturais que comprovam a obtenção do produto reacional no item resultados.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Síntese do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂:

3.3.1.1. Síntese do macroiniciador Br-PCL-Br:

A preparação do macroiniciador baseou-se na metodologia utilizada por Sun (2005). Para tal, foi empregado um balão de duas bocas contendo dimetilaminopiridina (DMAP: 0,036 g, 0,29 mmóis), trietilamina seca (TEA: 0,041 mL, 0,29 mmóis) e clorofórmio seco (CHCl_3 : 3 mL), o qual foi mantido em banho de gelo sob agitação e gás argônio. A seguir, adicionou-se 0,1 mL de brometo de 2-bromo isobutirila (0,8 mmóis) em 3 mL de clorofórmio. Então foi adicionado 1,5 g de PCL (Sigma Aldrich código 440752 foi analisado, apresentando $M_w = 16698$ g/mol, $M_n = 11216$ g/mol, índice de polidispersividade (PDI) de 1,48, 0,14 mmóis) em 15 mL de

clorofórmio. A razão molar empregada foi polímero:substituinte:ligante:catalisador (1:5:2:2).

O sistema reacional foi mantido por 10 minutos sob argônio e após, mantido em agitação por 7 dias a 25°C (macroiniciador antigo = MIA) e, posteriormente a reação foi otimizada para 3 dias a 40°C (macroiniciador = MI).

O produto foi dissolvido em THF e precipitado em ciclohexano, filtrado, lavado com éter etílico e seco, sendo mantido em dessecador por 24 horas (macroiniciador tratado 1 = MIT1). O produto foi novamente solubilizado em 10 mL de clorofórmio e extraído três vezes com 10 mL de ácido clorídrico a 1M (elimina resíduos de DMAP e TEA), sendo a fase orgânica rotaevaporada. Após, foi solubilizado em THF e precipitado em éter etílico gelado (elimina brometo de 2-bromoisobutirila que não reagiu com PCL), sendo filtrado e seco a vácuo (macroiniciador tratado 2 = MIT2). A reação química está representada na Figura 6.

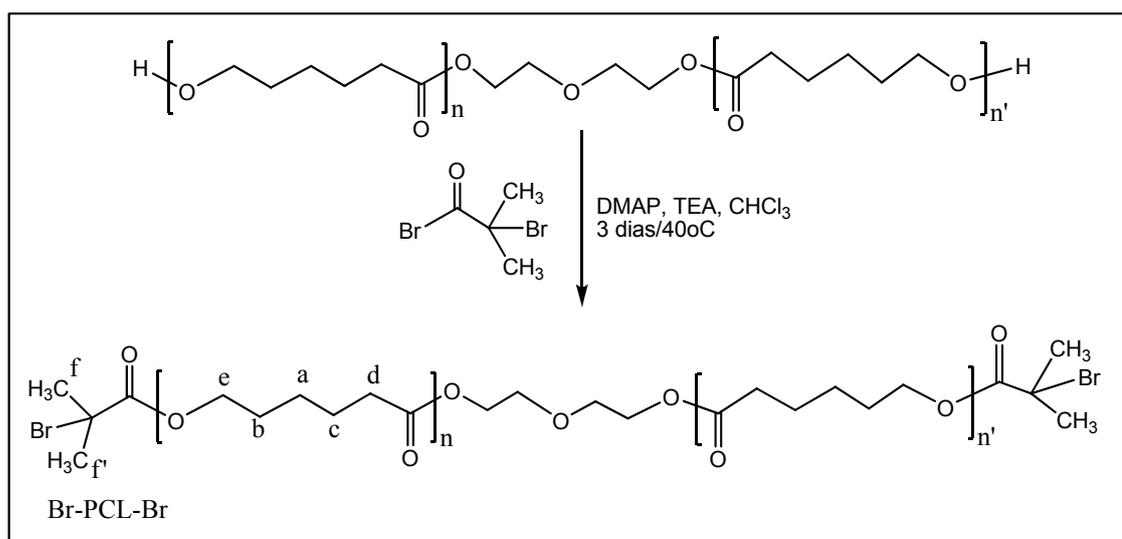


Figura 6. Síntese do macroiniciador Br-PCL-Br.

A molécula de PCL possui duas unidades polioxidoetilenoglicol (PEG) no centro da estrutura e suas hidroxilas de extremidades foram substituídas por uma porção bromada proveniente do brometo de 2-bromo isobutirila através de reação de substituição, obtendo-se o macroiniciador Br-PCL-Br. O produto obtido apresentou-se como sólido branco a levemente amarelado.

Conversões: MIAT1 = 86% (mol), MIT1 = 87% (mol) e, MIT2 = 81% (mol).

IV_{MIAT1} (filme sobre cristal NaCl): 3448, 2933, 2732, 2632, 2487, 1724, 1641 cm^{-1} .
 GPC_{MIAT1} : $M_w = 11,3$ kDa, $M_n = 14,7$ kDa, PDI = 1,30. RMN $^1H_{MIAT1}$ (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 1,3 (s, 4H_a), δ 1,6 (m, 8H_{b,c}), δ 1,9 (s, 1H_{f,f'}), δ 2,3 (t, 4H_d), δ 4,0 (t, 4H_e).

IV_{MIT2} (filme sobre cristal NaCl): 2927, 1727 cm^{-1} . GPC_{MIT2} : $M_w = 20,0$ kDa, $M_n = 13,0$ kDa, PDI = 1,50. RMN $^1H_{MIT2}$ (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 1,3 (m, 4H_a), δ 1,6 (m, 8H_{b,c}), δ 1,9 (s, 1H_{f,f'}), δ 2,2 (t, 4H_d), δ 4,0 (t, 4H_e). RMN $^{13}C_{MIT2}$ (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 24,6 (Ca), δ 25,3 (Cb,C), δ 28,3 (Ch,h'), δ 33,9 (Cd), δ 63,9 (Ce), δ 173,4 (CA).

3.3.1.2. Síntese do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ por ATRP (denominado MLT-20):

Partindo do macroiniciador Br-PCL-Br (MIAT1), procedeu-se a polimerização controlada pela técnica ATRP empregando 1:1 p/p dos monômeros, segundo Miguel et al (2008).

Em balão foram colocados brometo de cobre (I) (CuBr(I), 12 mg, 0,084 mmóis), N,N,N',N',N"-pentametildietenotriamina (PMDETA, 25 mg, 0,14 mmóis), MMA (1 g, 10 mmóis), DMAEMA (1 g, 6,3 mmóis, adição sequencial dos monômeros), macroiniciador Br-PCL-Br (0,3 g, $2,7 \cdot 10^{-2}$ mmóis) e 3 mL de anisol. O sistema foi degaseificado em argônio a temperatura ambiente por 10 minutos e mantido em banho de silicone a 70°C sob agitação, durante 1 hora. A reação foi finalizada por exposição ao ar e adição de 3 mL de THF. A razão molar foi DMAEMA:MMA:Br-PCL-Br:CuBr:PMDETA (550:1:3:5).

Nesta reação, o MMA foi empregado como monômero devido à quantidade utilizada, enquanto Baines (1996) cita que o mesmo pode agir como um facilitador de polimerização. A reação química está representada na Figura 7.

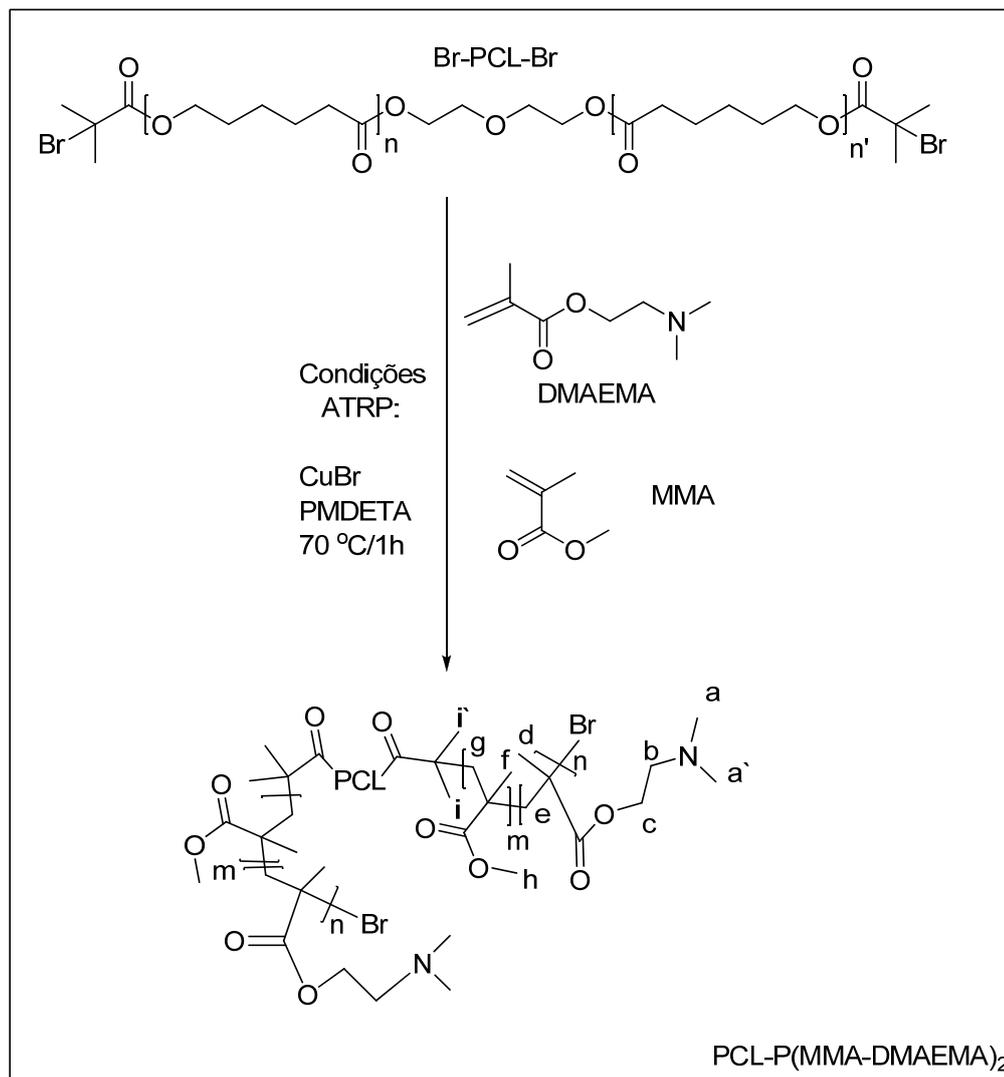


Figura 7. Reação de polimerização de PCL-P(MMA-DMAEMA)₂.

O produto apresentou aspecto esverdeado e foi filtrado por coluna de sílica gel 60 e precipitado em ciclohexano em banho de gelo, filtrado e seco. O produto obtido após o tratamento apresentou aspecto branco acinzentado e teve rendimento de 45% (mol).

$IV_{\text{(filme sobre cristal NaCl)}}$: 3440, 2954, 2821-2765, 1725 cm^{-1} . GPC: $M_n = 28,8$ kDa, $M_w = 49,4$ kDa, PDI = 1,70. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta 1,0$ (s, 6 $H_{d,f}$), $\delta 1,4$ (s, 1 H_{PCL}), $\delta 1,6$ (m, 2 H_{PCL}), $\delta 1,9$ (s, 4 $H_{e,g}$), $\delta 2,4$ (s, 7 $H_{a,a',\text{PCL}}$), $\delta 2,6$ (s, 4 H_b), $\delta 3,6$ (s, 3 H_h), $\delta 4,1$ (s, 3 H_c). RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta 18-19$ (C_{PCL}), $\delta 24,5$ ($C_{a,a'}$), $\delta 28,3$ ($C_{d,c}$), $\delta 45,6$ (C_h), $\delta 173,5$ (C_A), $\delta 176,9$ (C_B).

3.3.1.3. Síntese de copolímeros PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ por ATRP (produtos denominados MLT20/CF01 e MLT20/CF02):

Essas reações foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir a presença de MMA no copolímero, passando a utilizar 9:1 DMAEMA:MMA (p:p) e avaliar a influência da temperatura/tempo de reação na formação do copolímero.

Em um balão foram colocados 22 mg de CuBr (0,15 mmóis), 38 mg de PMDETA (0,22 mmóis), 0,05 g de MMA (0,5 mmóis), 0,45 g de DMAEMA (2.83 mmóis) e 0,4 g de Br-PCL-Br (MIAT1, 0.036 mmóis). O mesmo foi mantido em argônio por 15 minutos a t. a.

A reação MLT20/CF01 foi colocada a 65°C durante 1 hora e retirada para tratamento e, a reação MLT20/CF02 foi preparada da mesma forma, entretanto, empregando 94°C por 3 horas, e mantendo o balão dentro do banho por 19 horas, até alcançar a temperatura ambiente para então ser tratado.

O tratamento de ambos envolveu a solubilização em THF seco e precipitação em ciclohexano gelado (duas vezes). Os produtos apresentaram-se como sólidos brancos levemente esverdeados. A razão molar para ambos foi de DMAEMA:MMA:Br-PCL-Br:CuBr:PMDETA (90:1:4:6), sendo 80:10 a proporção molar dos metacrilatos, respectivamente.

Rendimentos: 51% (mol) para MLT20/CF01 e, 64% (mol) para MLT20/CF02.

$IV_{MLT20/CF01}$ (filme sobre cristal NaCl): 3421, 2950, 1727 cm^{-1} . GPC $_{MLT20/CF01}$: $M_n = 12,9$ kDa, $M_w = 127,9$ kDa, PDI = 9,92. RMN $^1H_{MLT20/CF01}$ (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 1,0 (s, 6H_{d,f}), δ 1,2 (s, 6H_{PCL}), δ 1,4 (s, 10H_{PCL}), δ 1,6 (m, 4H_{e,g}), δ 2,4 (s, 12H_{a,a',PCL}), δ 2,7 (4H_b), δ 3,6 (s, 2H_h), δ 4,2 (s, 6H_{c,PCL}).

$IV_{MLT20/CF02}$ (filme sobre cristal NaCl): 3430, 2954, 1725 cm^{-1} . GPC $_{MLT20/CF02}$: $M_n = 12,0$ kDa, $M_w = 17,0$ kDa, PDI = 1,41. RMN $^1H_{MLT20/CF02}$ (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 1,0 (s, 6H_{d,f}), δ 1,4 (s, 2H_{PCL}), δ 1,6 (s, 3H_{PCL}), δ 1,8 (s, 4H_{e,g}), δ 2,3 (s, 10H_{a,a',PCL}), δ 2,6 (s, 4H_b), δ 3,6 (s, 3H_h), δ 4,0 (s, 6H_{c,PCL}).

3.3.1.4. Síntese dos copolímeros PCL-P(MMA-DMAEMA-Br)₂ por técnica ATRP-ARGET (produtos denominados ARGET-A e ARGET-B):

Essa síntese baseou-se nos trabalhos de Dong (2008) e Kwak (2009), o produto foi obtido conforme descrito a seguir.

Em um frasco de vidro, preparou-se uma solução contendo 6 mg de brometo de cobre I (CuBr (I), 0,04 mmóis), 140 mg de PMDETA (0,8 mmóis) e 1 mL de anisol. Em um balão reacional adicionou-se 1,75 g de Br-PCL-Br (0,08 mmóis, MIT2), 1 g de

DMAEMA (6,3 mmól) e 65 mg de MMA (0,64 mmól) em 2 mL de anisol, sendo degaseificado sob argônio a 25°C. Após 10 minutos, adicionou-se 0,1 mL da primeira solução contendo CuBr:PMDETA:anisol (6 mg:140 mg:1 mL) e, adicionou-se 32 mg de etilhexanoato de estanho (0,08 mmól) em 2 mL de anisol. O argônio foi mantido por 10 minutos e a reação se deu a 90°C por 24h.

O produto foi solubilizado em THF, precipitado em ciclohexano gelado (T1). Após secagem, o produto foi novamente solubilizado em metanol e precipitado duas vezes em ciclohexano (T2, para remover etilhexanoato de estanho e anisol).

Devido à pequena quantidade de MMA empregado nesta síntese, este monômero teve função de facilitador de polimerização (BAINES, 1996).

A razão molar desta reação foi de DMAEMA:MMA:Br-PCL-Br:CuBr:PMDETA:Etanoato de estanho (40:4:1:0,025:0,5:0,5), obtendo-se o produto com aspecto de sólido branco a amarelado, com rendimento de $70 \pm 2\%$ (mol, ARGET-A T2).

$IV_{(\text{filme sobre cristal NaCl})}$: 3430, 2940-2860, 1720 cm^{-1} . GPC: $M_n = 4,4$ kDa, $M_w = 20,6$ kDa, PDI = 4,60. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,0 (s, $2H_{d1,b2}$), δ 1,4 (m, $4H_{\text{PCL}}$), δ 1,7 (m, $8H_{\text{PCL}}$), δ 1,9 (s, $1H_{h,h'}$), δ 2,0 (s, $4H_{e1,c2}$), δ 2,3 (m, $6H_{a,a'}$, PCL), δ 2,7 (s, $1H_{b1}$), δ 3,7 (m, $1H_{a2}$), δ 4,2 (t, $4H_{c,PCL}$). RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 24,3, δ 25,3, δ 28,1, δ 33,9, δ 39,9, δ 63,9, δ 164,9, δ 173,2.

O PMMA é relatado como um copolímero de baixa toxicidade e por esta razão, a síntese do copolímero foi otimizada, reduzindo-se a quantidade de MMA presente no composto, passando a chamar-se ARGET-B (BAINES, 1996). Para a produção do copolímero ARGET-B, realizou-se o mesmo processo descrito acima, exceto pela quantidade de MMA que passou a ser de 19 mg (0,18 mmól, uma gota).

O produto obtido foi purificado da mesma forma que o anterior, apenas pelo tratamento 1. A razão molar para reação ARGET-B foi de DMAEMA:MMA:Br-PCL-Br:CuBr:PMDETA:Etanoato de estanho (40:1,5:1:0,025:0,5:0,5), com obtenção do produto de aspecto sólido branco, com rendimento de $30 \pm 2\%$ (mol, ARGET-B).

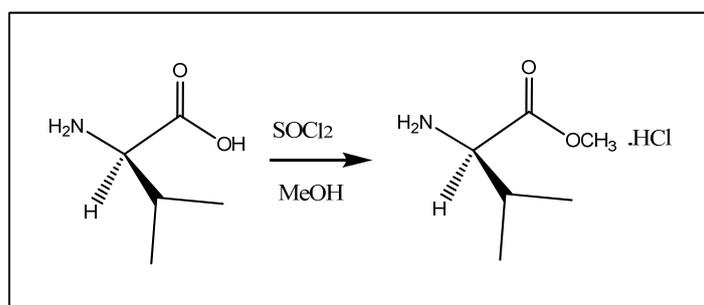
$IV_{(\text{filme sobre cristal NaCl})}$: 3403, 2935-2857, 1720 cm^{-1} . GPC: $M_n = 3,35$ kDa, $M_w = 5,99$ kDa, PDI = 1,79. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,2 (s, $1H_{d1,b2}$), δ 1,3 (m, $4H_{\text{PCL}}$), δ 1,6 (m, $8H_{\text{PCL}}$), δ 1,9 (s, $1H_{e1,c2}$), δ 2,0 (s, $4H_{h,h'}$), δ 2,2 (m, $4H_{a,a'}$, PCL), δ 2,9 (s, $4H_{b1}$), δ 3,5 (m, $1H_{a2}$), δ 4,0 (m, $4H_{c1,PCL}$).

3.3.2 Síntese do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ funcionalizado com o tripeptídeo LDV:

O tripeptídeo LDV foi sintetizado, de forma parcial, por síntese em solução, conforme exposto nos passos seguintes.

3.3.2.1. Proteção do grupamento ácido de L-valina:

A reação de esterificação metílica foi realizada conforme Zhou et al (2010) e Ma (2010) em razão molar de 1:1,2:250 (aa:SOCl₂:MeOH), conforme o esquema 4.



Esquema 4. Esterificação metílica da L-valina.

O procedimento envolveu o sistema com um balão reacional, no qual adicionou-se 1,0 g de L-valina (8,5 mmol) em 10,0 mL metanol seco, sendo mantido sob argônio a 0°C por 10 minutos, em agitação. Posteriormente, adicionou-se 0,74 mL de cloreto de tionila seco (1,2 equivalentes ou 10,2 mmol), e após 10 minutos, a reação foi mantida a 25°C por 24 horas e rotaevaporada, obtendo-se 1,118 g do produto desejado.

O produto apresentou aspecto de sólido branco a levemente amarelado, sendo armazenado em temperatura ambiente na forma de cloridrato.

IV_(filme sobre cristal NaCl): 3444, 2894, 1741, 1286, 1242 cm⁻¹. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,0 (dd, 6H_a, ³J_{Ha-Hb} = 7,05 Hz), δ 2,4 (m, 1H_b), δ 2,8 (s, 3H_e), δ 3,9 (m, 1H_c), δ 8,8 (s, 3H_e).

3.3.2.2. Síntese dos dipeptídeos BocAsp(OBn)Val(OMe) e FmocAsp(OtBu)Val(OMe):

A síntese de dipeptídeos com diferentes grupos de proteção amínicos ocorreu conforme a Figura 8 e o procedimento reacional descrito a seguir.

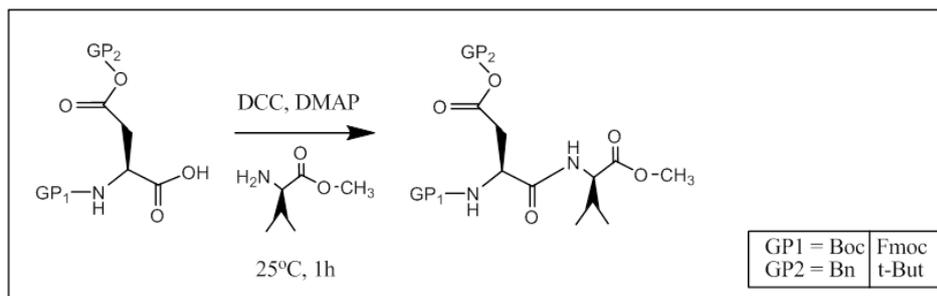


Figura 8. Formação dos dipeptídeos.

Em um balão adicionou-se 10 mL de diclorometano seco, sob argônio a 0°C. Em seguida, adicionou-se 0,5 g do ácido aspártico protegido (BocAsp(OBn)OH a 1,55 mmol ou FmocAsp(OtBu)OH a 1,21 mmol). Após 10 minutos adicionou-se 1,5 equivalentes de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 0,4 g) e manteve-se 30 minutos a 0°C. A seguir, adicionou-se uma mistura previamente preparada sob atmosfera inerte a 25°C contendo 1,5 equivalentes de L-valOMe.HCl (0,3 g), 3 equivalentes de trietilamina seca (0,3 mL) em 5 mL de diclorometano seco. O sistema reacional foi mantido a 25°C e após 10 minutos, adicionou-se DMAP a 10% equivalentes (em relação ao ácido aspártico protegido de partida).

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel ciclohexano:acetato de etila 2:1 (v/v), cuja revelação se deu em luz ultravioleta e, sob valinila/calor. O fator de retenção dos produtos foram $R_f = 0,40$ e $1,1$, respectivamente.

Após 1 hora, a reação foi colocada em banho de gelo por 10 minutos a fim de auxiliar na precipitação da diciclohexilurea (DCU) formada e, filtrada sob vácuo e/ou quando necessário, o DCU residual foi removido adicionando ao produto acetonitrila, centrifugando e isolando o sobrenadante o qual foi rotaevaporado.

O sólido obtido foi identificado por DCU pela análise de infravermelho e o líquido coletado foi extraído em funil de separação com solução HCl 0,1 M (retira o DMAP residual e aminoácido Val(OMe) que não reagiu), solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10% (retira o aminoácido Asp protegido de partida que não reagiu)/1 mL Brine 28% (NaCl 28%, auxilia na separação de compostos orgânicos de aquosos), água (retirar aminoácido com extremidade livre que não reagiu) e Brine 28% novamente. À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, filtrado e rotaevaporado obtendo um produto oleoso incolor a levemente amarelado que foi armazenado em temperatura ambiente em dessecador.

Na síntese de BocAsp(OBn)Val(OMe) obteve-se 0,56 g de produto, tendo um rendimento de 40% e, para FmocAsp(OtBu)Val(OMe) obteve-se 0,8537 g que reflete em rendimento de 60% (rendimentos calculados com base no mol da valina).

A troca de grupo de proteção da cadeia lateral do ácido aspártico de benzila para terc-butila é importante devido a minimizar a formação de arpartimida durante a reação de síntese do peptídeo (FISCHER, 1994).

IV BocAsp(OBn)Val(OMe)_(filme sobre cristal NaCl): 3320, 2927, 1741 cm⁻¹. RMN ¹H BocAsp(OBn)ValOMe (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,9 (dd, 6H_a, ³J_{Ha-Hb}=7,05 Hz), δ 1,4 (s, 9H_k), δ 2,2 (m, 1H_b), δ 2,7 (dd, 2H_d, ³J_{Hd-Hc} = 6,45 Hz), δ 3,0 (dd, 2H_g, ³J_{Hg-Hf} = 4,7 Hz), δ 3,7 (s, 3H_e), δ 4,0 (s, 1H_c), δ 4,5 (q, 1H_f, ³J_{Hf-Hg} = 4,7 Hz; ³J_{Hf-Hj} = 8,22 Hz), δ 5,1 (d, 2H_h), δ 5,7 (d, 1H_j, ³J_{Hj-Hf} = 8,22 Hz), δ 7,0 (d, 1H_j, ³J_{Hj-Hf} = 8,22 Hz), δ 7,3 (s, 5H_i).

IV FmocAsp(OtBu)Val(OMe)_(filme sobre cristal NaCl): 3332, 2960, 2844, 1718, 1623 cm⁻¹. RMN ¹H FmocAsp(OtBu)ValOMe (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,9 (dd, 6H_a, ³J_{Ha-Hb}=7,04 Hz), δ 1,4 (s, 9H_i), δ 2,2 (m, 1H_b), δ 2,6 (d, 1H_d, ³J_{Hd-Hc} = 7,40 Hz), δ 2,8 (d, 2H_g, ³J_{Hg-Hf} = 4,11 Hz), δ 3,7 (s, 3H_e), δ 4,1 (s, 1H_c), δ 4,2 (m, 1H_l), δ 4,4 (m, 2H_k), δ 6,1 (s, 1H_j), δ 7,3 (s, 8H_m).

3.3.2.3. Desproteção do grupamento t-butoxicarbonil (Boc) do dipeptídeo:

O procedimento envolveu a adição de 50 mg de BocAsp(OBn)ValOMe em 2 mL de solução TFA:DCM 9:1 (v/v). A reação foi mantida a 40°C por 1 hora, sendo acompanhada CCD (mesmas condições empregadas para o dipeptídeo) e, permaneceu sob agitação por 24 horas. Ao término de 24 horas, a reação foi rotaevaporada. O produto apresentou aspecto de sólido branco, sendo armazenado em temperatura ambiente. Não foi realizado o controle do rendimento da reação.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,9 (s, 6H_a), δ 2,2 (s, 1H_b), δ 3,1 (s, 1H_d), δ 3,3 (s, 2H_g), δ 3,6 (s, 3H_e), δ 5,1 (s, 2H_h), δ 7,4 (m, 5H_i), δ 8,4 (s, 3H_j).

3.3.2.4. Desproteção do grupamento 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) do dipeptídeo e purificação:

Em um balão foi adicionado 0,254 g do dipeptídeo FmocAsp(OtBu)ValOMe (0,48 mM) em 5 mL de piperidina. A reação foi mantida a 25°C sob agitação por 45

minutos (CARPINO, 1972), sendo acompanhada por CCD (mesmas condições citadas anteriormente). O produto da desproteção teve $R_f = 1,0$.

Para remover sinais de piperidina do produto, o tratamento envolveu a injeção do produto de reação por meio de seringa em 100 mL de água MilliQ gelada, sob agitação. Ocorreu a precipitação do aduto piperidina-dibenzenufulveno como um sólido branco, o qual foi removido por filtração (CARPINO, 1972, p. 6). O líquido filtrado foi rotaevaporado e, então foi adicionado etanol:água 10:1 (v/v) para recrystalizar o produto. Entretanto, após o material ter sido resfriado no freezer e surgir indícios da formação de recrystalização, não foi possível coletar o produto, pois ao retirar o balão do freezer a precipitação retornava a solubiizar. Sendo assim, o solvente foi rotaevaporado e o produto analisado. O rendimento não foi controlado.

RMN ^1H (300 MHz, D_2O , ppm): $\delta 0,9$ ppm (m, 6Ha), $\delta 1,42$ ppm (s, 9Hi), $\delta 2,17$ ppm (m, 1Hb), $\delta 2,6-2,8$ ppm (m, 2Hg), $\delta 3,07$ ppm (s, 3He), $\delta 3,6-3,8$ ppm (m, 1Hc), $\delta 4,17$ ppm (m, 1Hf), $\delta 6,4-6,7$ ppm (2s, 1Hd, 1Hj), $\delta 7,9$ ppm (d, 1HNi).

3.3.2.5. Ligação peptídeo com IEM:

A conjugação do peptídeo com IEM foi pensada por meio de duas estratégias, descritas abaixo.

- Estratégia 1 (ANEXOS)
- Estratégia 2: composta por três etapas, subsequentes a aquisição do tripeptídeo LDV comercialmente:

2.1 Esterificação metílica do LDV com cloreto de tionila em metanol (Figura 9)

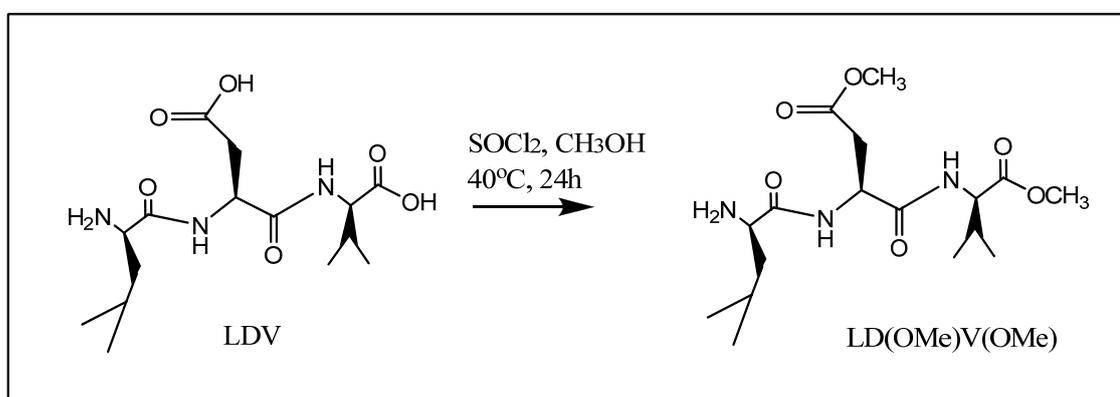


Figura 9. Esterificação metílica do LDV.

A estratégia 2 foi escolhida devido ao menor número de etapas envolvidas e rapidez de obtenção do produto desejado. Desta forma, a etapa **2.1** realizou-se em um balão reacional por adição de 0,1077 g do tripeptídeo LDV (0,29 mmol, GenScript), três equivalentes de cloreto de tionila previamente destilado (0,1 mL) e 6 mL de metanol seco, mantendo-se sob argônio por 20 minutos. Sobre o balão foi adaptado um condensador com circulação de água e um borbulhador. A reação foi submetida a 40°C por 24 horas. Ao término do período, a reação foi rotaevaporada com dois traps, um sob NaOH 1 M. E, posteriormente, por arraste adicionando metanol e rotaevaporando, o cloreto de tionila foi eliminado, obtendo 94,44% de conversão.

IV: 3500 a 2500, 1735, 1718, 1629, 1436 a 1369, 1200 a 1100 cm^{-1} . RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,9 ppm (m, 12Ha,m), δ 1,24 ppm (s, 1H_{água}), δ 1,84 ppm (s, 3Hk,l), δ 2,19 ppm (s, 1Hhb), δ 3,21 ppm (s, 6Hg,NI), δ 3,47 ppm (s, 6He,h), δ 3,65-3,94 ppm (3 s, 7HNI), δ 4,43 ppm (s, 2Hj,c), δ 5,02 ppm (s, 1Hf), δ 7,43 ppm (s, 1Hi), δ 8,12 ppm (s, 3Hn).

2.2 Reagir LD(OMe)V(OMe) com IEM, obtendo IEM-LD(OMe)V(OMe) (Figura 10).

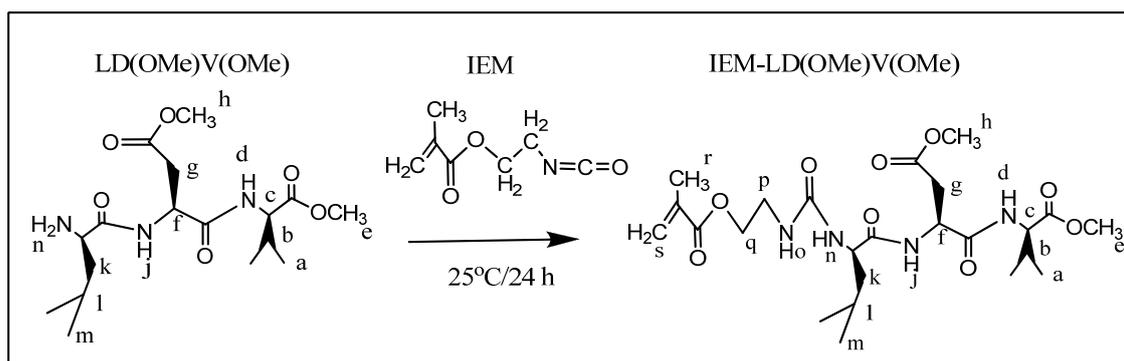


Figura 10. Reação LD(OMe)V(OMe) com IEM.

Para tal, partiu-se de 88,7 mg (0,216 mmol) de HCl.LD(OMe)V(OMe) em 30 mL de água MilliQ a 25°C, sob agitação. Adicionou-se NaOH 1 M até atingir pH 9,6 e a seguir adicionou-se 1000 μL de IEM (7,077 mmol). A reação foi mantida 24 horas a 25°C, sendo acompanhada por CCD (FM = ciclohexano:acetato de etila 2:1). A fase

aquosa foi extraída com diclorometano (2 x 5 mL), e acidificada com HCl 1 M até pH = 1,0. Após, foi extraída com butanol (3x 5 mL) e a fase orgânica foi rotaevaporada. O Rf do produto foi de 1,5, com rendimento de 95% (mol).

IV: 3412, 2953, 2922, 2864, 1720, 1631, 1454, 1377, 1310, 1292, 1151, 906, 734 cm^{-1} . RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,91 ppm (t, 12Ha,m, $^3J_{\text{Ha-Hb/Hm-Hl}}=7,30$ Hz), δ 1,37 ppm (m, 2Hk,l), δ 1,54 ppm (m, 3Hh), δ 1,92 ppm (s, 3Hr), δ 2,17 ppm (s, 1Hb), δ 2,89 ppm (s, 2Hg), δ 3,50 ppm (s, 1 Hc), δ 3,63 ppm (t, 3He, $^3J=6,55$ Hz), δ 3,70 ppm (s, 2Hg), δ 4,23 ppm (m, 3Hp,f), δ 4,80 ppm (s, 1Hd), δ 5,58 e 6,12 ppm (2s, 2Hs), δ 7,42 e 8,12 ppm (2s, 2Hn,o).

2.3 Reagir IEM-LD(OMe)V(OMe) com o copolímero PCL-b-P(MMA-DMAEMA) $_2$ por método ATRP-ARGET(B) (Figura 11).

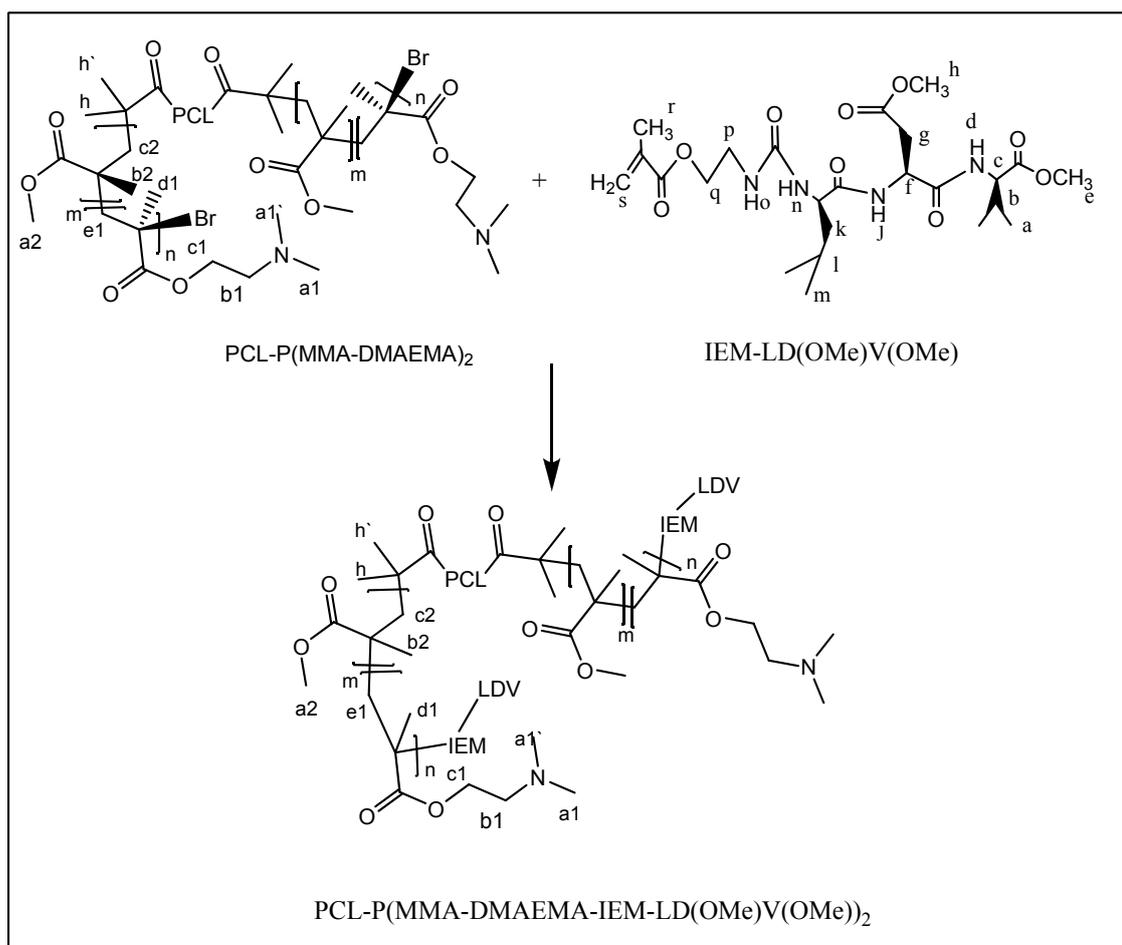


Figura 11. Reação do copolímero ARGET-B com IEM-LD(OMe)V(OMe).

Por fim, realizou-se a reação **2.3** via ATRP-ARGET, segundo adaptações do procedimento de Ayres (2005).

Em um frasco Schlenk, foram colocados 0,150 g de copolímero ARGET-B e 0,094 g de produto IEM-LD(OMe)V(OMe), 1 mL de DMSO_{d6} (não solubilizou todo o material) e 1 mL de anisol seco. A reação foi submetida a dois ciclos de argônio por 10 minutos e vácuo por 5 minutos e foi colocada a 48°C por 24 horas. Ao término do período, a reação foi colocada em éter gelado para precipitação (formou camada líquida amarela com pequeno precipitado branco). O material foi rotaevaporado e adicionado água, sendo o pH medido (pH = 3,11). Após adicionou-se solução de ácido clorídrico 1M para atingir pH = 1,00 (houve aumento da quantidade de material precipitado branco). O material foi novamente rotaevaporado e seco em bomba de vácuo. O rendimento não foi estipulado.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ0,91 ppm (m, 1H_{d1,b2}), δ1,36 ppm (m, 4H_{aPCL}), δ1,92 ppm (m, 1H_{rIEM}), δ1,98 ppm (s, 1H_{h,h'}), δ2,14 ppm (m, 1H_{bVal}), δ2,28 ppm (t, 4H_{dPCL}, ³J_{Hd-Hc} = 7,63 Hz), δ 2,49 ppm (m, 1H_{b1}), δ 2,94 ppm (m, 1H_g), δ3,44-3,71 ppm (m, 4H_{eVal}, 1H_{qIEM}), δ4,03 ppm (t, 4H_{ePCL}, ³J_{He-Hb} = 6,46 Hz), δ4,22 ppm (m, 1H_{piEM}), δ4,42 ppm (m, 1H_{fAsp}), δ4,77 ppm (m, 1 H_{dAsp-Val}), δ5,59, 6,13 ppm (m, 1H_{siEM}) e δ7,51 ppm (m, 2H_{o,niEM}).

4 RESULTADOS DO CAPÍTULO 1

Os resultados serão apresentados seguindo a seguinte ordem: produtos de síntese para a obtenção do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ por ATRP e ATRP-ARGET e, produtos para a funcionalização do copolímero com o LDV.

4.1 RESULTADOS DO COPOLÍMERO PCL-P(MMA-DMAEMA)₂

4.1.1 Resultados da caracterização do macroiniciador Br-PCL-Br:

A PCL e o macroiniciador Br-PCL-Br foram avaliados por infravermelho e interpretados com base em Pavia (1996) e Silverstein (2010), sendo os espectros sobrepostos apresentados na Figura 12.

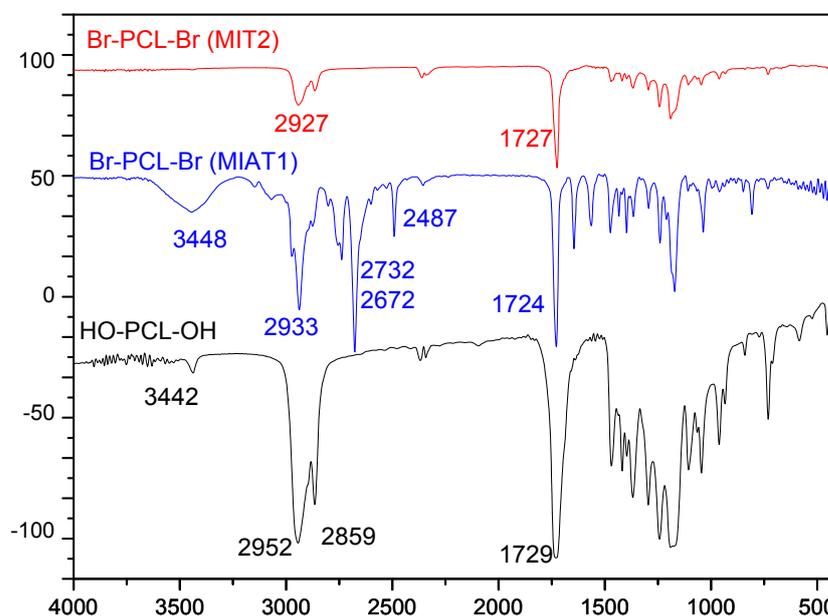


Figura 12: Espectro de infravermelho de PCL diol e do macroiniciador Br-PCL-Br, preparado em 7 dias/25°C após o tratamento 1 (MIAT1) e preparado em 3 dias/40°C após o tratamento 2 (MIT2).

O espectro de infravermelho da PCL diol de 14 kDa mostra, em 3442 cm⁻¹ ligação -O-H referente às extremidades da molécula, ou, ainda, pode representar o

overtone da carbonila. Na região de 2952 a 2859 cm^{-1} ocorre a deformação axial de $-\text{CH}$ de alcanos e, em 1729 cm^{-1} têm-se a deformação de $-\text{C}=\text{O}$, na região de 1460 e 734 cm^{-1} há a deformação axial de $-\text{CH}_2$, em 1394 a 1363 cm^{-1} a deformação de $-\text{CH}_3$, em 1292 a 1178 cm^{-1} ocorre a deformação axial de $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ e em 872 a 576 cm^{-1} a deformação de $-\text{CH}_2$.

No espectro do macroiniciador Br-PCL-Br MIAT1 observa-se de 2933 a 2800 cm^{-1} ocorre deformação axial de $-\text{CH}$ sp^3 , em 2487 e 1641 cm^{-1} temos os sinais de ligação $\text{C}=\text{C}$ proveniente de resíduos de aminas da reação devido ao uso de DMAP e em 1724 cm^{-1} a deformação de $-\text{C}=\text{O}$ de éster.

No macroiniciador MIT2, observa-se a purificação do produto, o qual apresenta em 2927 cm^{-1} a ligação $\text{C}-\text{H}$ e em 1727 cm^{-1} a carbonila de éster levemente deslocada para a direita. As diferenças observadas na frequência da carbonila nos três materiais são 1729 cm^{-1} (PCL) para 1724 cm^{-1} (MIAT1) e 1727 cm^{-1} (MIT2), que referem-se aos efeitos de ressonância da ligação dupla.

Os espectros de RMN ^1H da PCL diol e MIAT1 encontram-se em anexos e, a seguir apresenta-se o resultado do MIT2 após tratamento por precipitação em hexano, extração com HCl 1M, rotaevaporado, solubilizado em THF e precipitação em éter é apresentado na Figura 13 (MIT2).

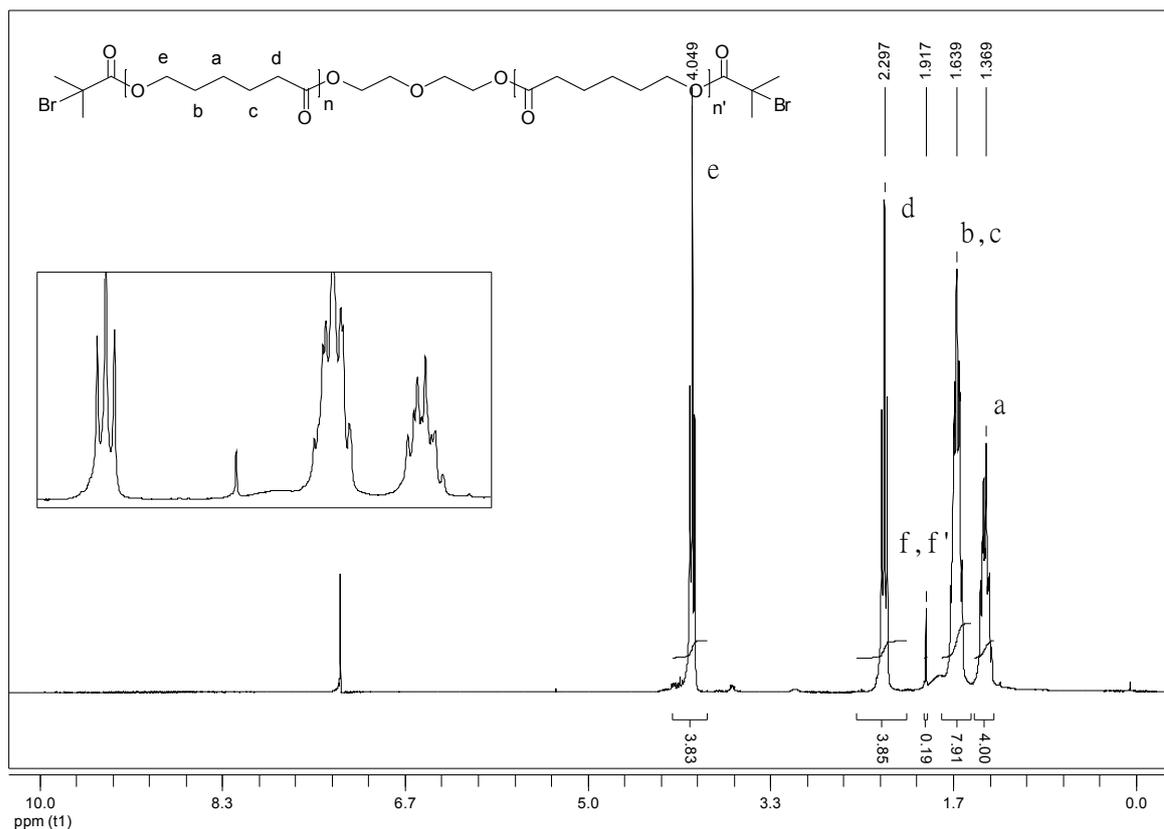


Figura 13. Espectro de RMN ^1H do macroiniciador Br-PCL-Br (MIT2, CDCl_3 , 300 MHz).

Observa-se que o sinal característico da ocorrência da reação química e da obtenção do produto Br-PCL-Br é a presença do singlete em 1,9 ppm, identificado como ressonâncias dos hidrogênios das metilas f e f' (grupo iso-propila), cuja intensidade (1H) é pequena devido extensão da cadeia da PCL de 14 kDa ou até mesmo, pela possibilidade de haver a presença concomitante de PCL mono e disubstituída. Considerando as integrações dos hidrogênios da molécula e a proporção entre f e a , encontra-se em torno de 67 unidades de CL no macroiniciador.

Abaixo, na Figura 14, há o espectro de RMN $^{13}\text{C}_{\text{MIT2}}$, confirmando a obtenção do produto.

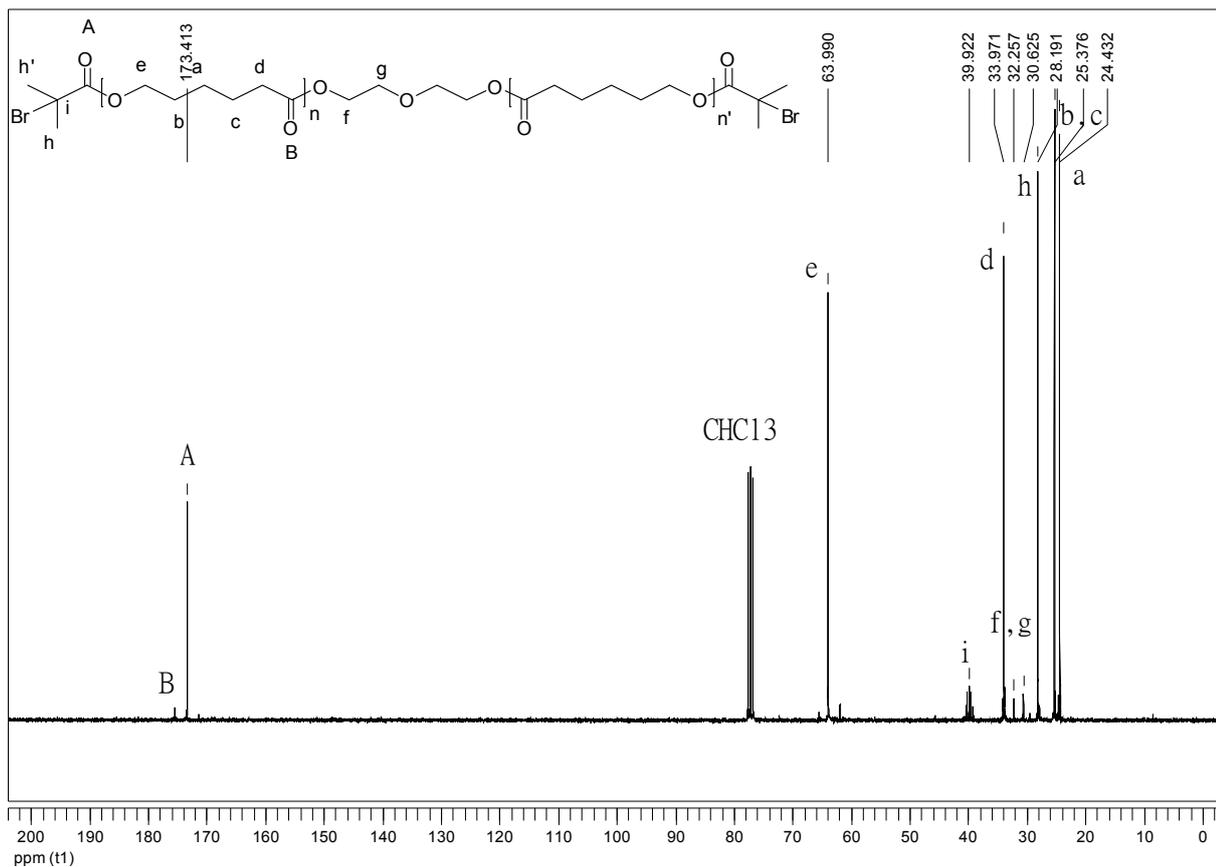


Figura 14. Espectro de RMN $^{13}\text{C}_{\text{MIT}2}$ do macroiniciador (CDCl_3 , 300 MHz).

No espectro da Figura 14, observam-se todos os carbonos presentes na molécula do macroiniciador, conforme indicados por letras. Em 24,4 e 25,3 ppm encontram-se Ca-c mais desblindados e, a presença em 28,3 ppm (Ch), confirma a obtenção do produto reacional. Os sinais de Cd e Ce mais blindados saem em 33,9 ppm e 63,9 ppm, respectivamente. Os carbonos de carbonila A e B saem em 173 e 176 ppm.

Também foram realizadas as análises de GPC, conforme perfil apresentado na Figura 15.

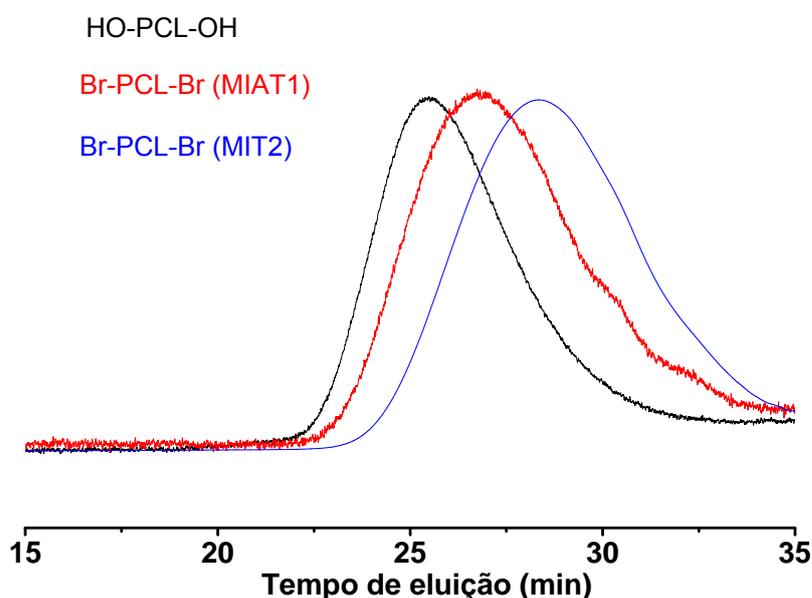


Figura 15. Análises de GPC da PCL diol e dos macroiniciadores MIAT1 e MIT2.

Na análise da PCL obtiveram-se as massas moleculares conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Massas molares obtidas por GPC para a PCL diol e os macroiniciadores.

Produto	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PDI
PCL diol	11,2	16,7	1,48
MIAT1	11,3	14,7	1,30
MIT2	13	20	1,5

Desta forma, comprova-se a obtenção do macroiniciador MIT2 em 3 dias a 40°C com conversão superior a 80%.

4.1.2 Resultados da caracterização do copolímero MLT-20:

A caracterização dos monômeros empregados na síntese do copolímero encontra-se em anexos, e uma vez conhecendo os compostos de partida, o copolímero obtido por ATRP e denominado MLT20 foi avaliado por infravermelho conforme apresentado na Figura 16.

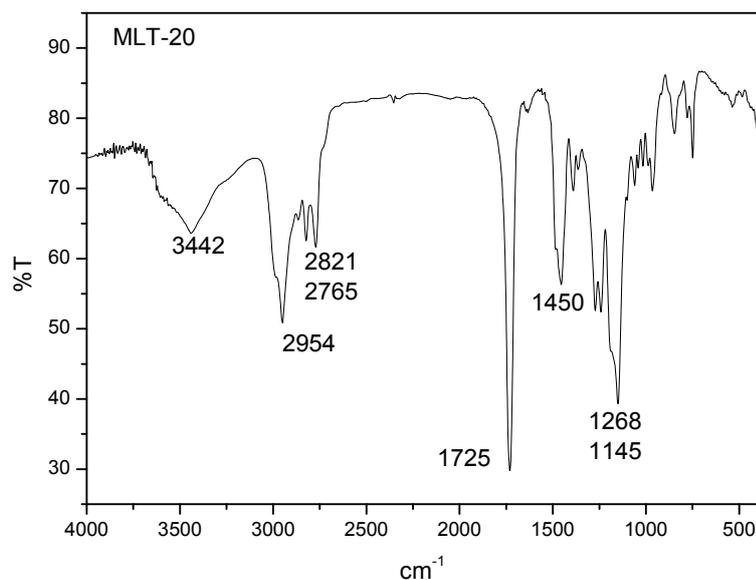


Figura 16. Espectro de infravermelho do copolímero MLT20.

O espectro do copolímero MLT20 apresenta em 3442 cm^{-1} vibrações de estiramento de ligação O-H possivelmente devido a amostra estar úmida, em 2954 cm^{-1} ocorre o sinal da ligação -C-H, 2821 a 2765 cm^{-1} temos as deformações axiais de -CH de alcanos saturados e, em 1725 cm^{-1} a ligação -C=O. Em 1450 cm^{-1} ocorre deformação de alcanos saturados e radicais alquila, em 1268 a 1145 cm^{-1} há os sinais de -C-N- e -C-O-C- de DMAEMA, em 744 cm^{-1} o sinal de $(-\text{CH}_2)_n$.

A curva de GPC é mostrada na Figura 17.

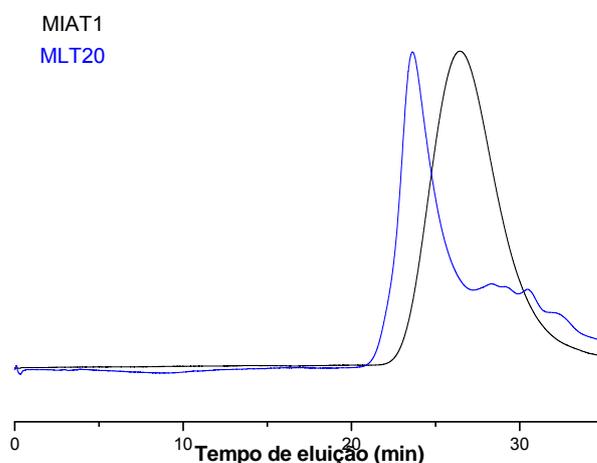


Figura 17. Curvas de GPC do copolímero MLT-20 e do seu macroiniciador (MIAT1).

O resultado de GPC apresenta para o copolímero $M_n = 28,8$ kDa ($M_w = 49,4$ kDa, $PDI = 1,70$) e, permite observar a eficiência do macroiniciador, mostrando a conversão deste em copolímero.

A análise por RMN 1H do copolímero está exposta na Figura 18.

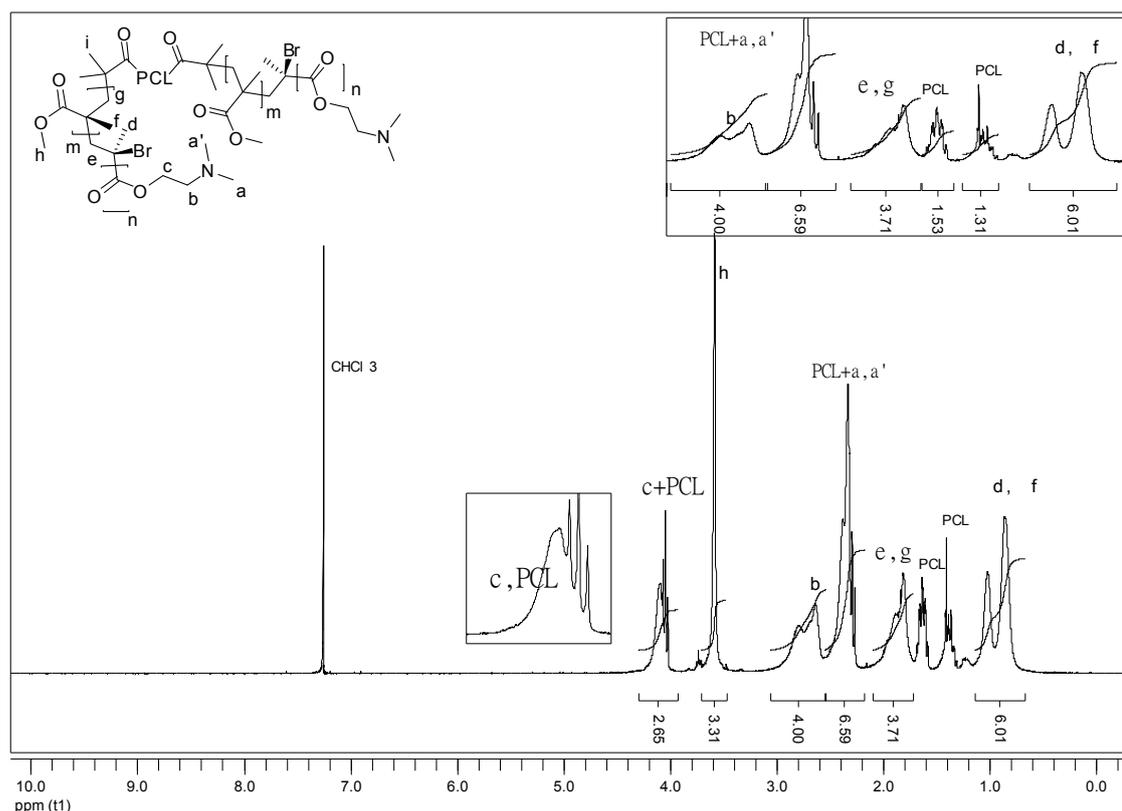


Figura 18. Espectro de RMN 1H do copolímero MLT20 ($CDCl_3$, 300 MHz).

Em 1,0 ppm encontram-se os hidrogênios de $-CH_3$ dos monômeros MMA e DMAEMA sob forma de singletos com integral de 6 H, seguidos de sinais de PCL em 1,4 e 1,6 ppm (proveniente do macroiniciador, cujas integrações foram de 1 H e 2 H). Em 1,9 ppm estão os hidrogênios de $-CH_2$ localizados entre MMA e DMAEMA e identificados por e e g (integral = 4 H). O sinal de ressonância em 2,4 ppm conjuga hidrogênios ligados ao nitrogênio de DMAEMA (a, a') com sinais de PCL (integral = 7 H). Em b (2,6 ppm) ocorrem os hidrogênios de $-CH_2$ próximos ao nitrogênio do DMAEMA (integral = 4 H), em 3,6 ppm há a ressonância do hidrogênio ligado a $-COOCH_3$ do MMA na forma de singlete (Hh; integral = 3 H) e por fim, em 4,1 ppm tem-se a conjugação de hidrogênio Hc do $-OCH_2$ do DMAEMA com hidrogênios de

PCL (integral = 3 H). Não há presença de hidrogênios dos monômeros (Ha) próximos a 6,0 ppm, logo conclui-se obtenção do copolímero.

A composição do copolímero MLT20 foi calculada com base no número de hidrogênios *b* do DMAEMA (2,6 ppm), hidrogênios *h* do MMA (3,6 ppm) e hidrogênios *a* do macroiniciador (1,4 ppm) e, baseado no valor da integral obtida no espectro acima. Logo, temos 67 unidades de CL:16 unidades de DMAEMA:6 unidades de MMA (64,5% DMAEMA:35,5% MMA). O espectro de RMN ^{13}C confirma esse resultado conforme apresentado a seguir na Figura 19.

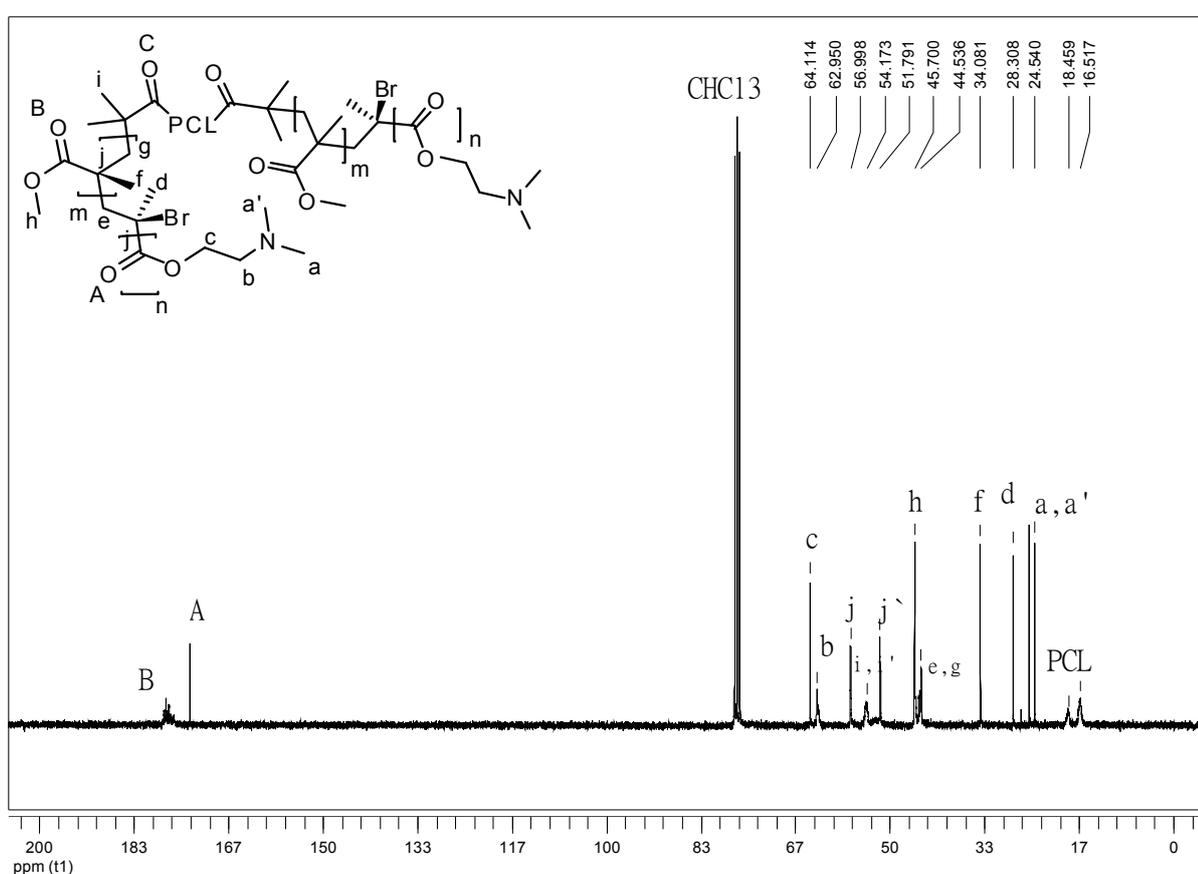


Figura 19. RMN ^{13}C do copolímero MLT20 (CDCl_3 , 300 MHz).

No espectro encontram-se os sinais de carbono da PCL entre 18 e 19 ppm, carbonos dos monômeros constituintes do copolímero (MMA e DMAEMA) aparecem em 24,5 e 28,3 ppm correspondendo ao *a*, *a'*, enquanto *Cd* e *Cc* aparecem mais blindados pela proximidade ao oxigênio na molécula e, a metila (*Ch*) de MMA encontra-se em 45,7 ppm. Os sinais das carbonilas aparecem em 173,5 ppm e 176,9 ppm.

4.1.3. Resultados de triblocos modificados MLT-20/CF01- 02:

O copolímero MLT-20/CF01 foi avaliado por GPC, conforme apresentado na Figura 20.

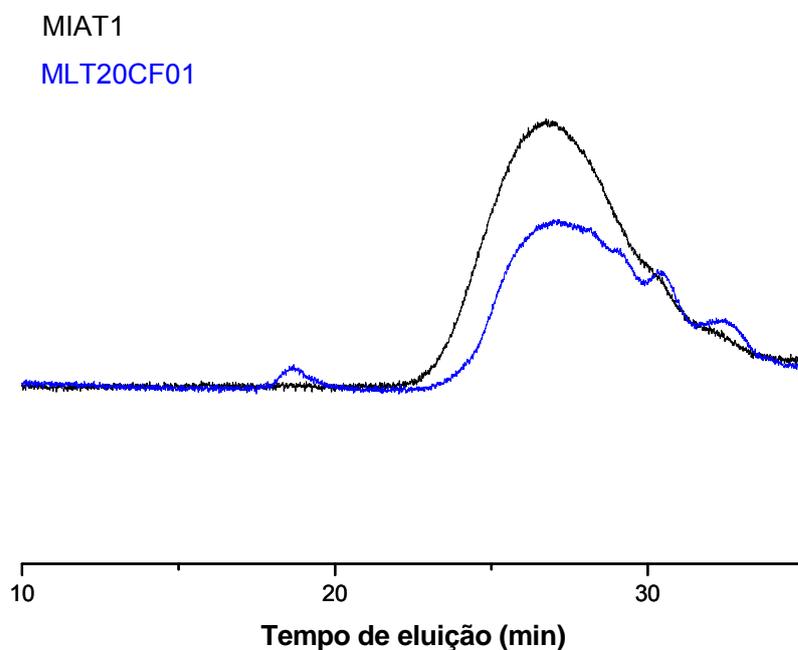


Figura 20. GPC de MLT-20/CF01 e seu macroiniciador (MIAT1).

Segundo a análise de GPC, o produto apresentou $M_n = 12,9$, $M_w = 127,9$ kDa e $PDI = 9,92$. A seguir, tem-se o infravermelho da amostra na Figura 21.

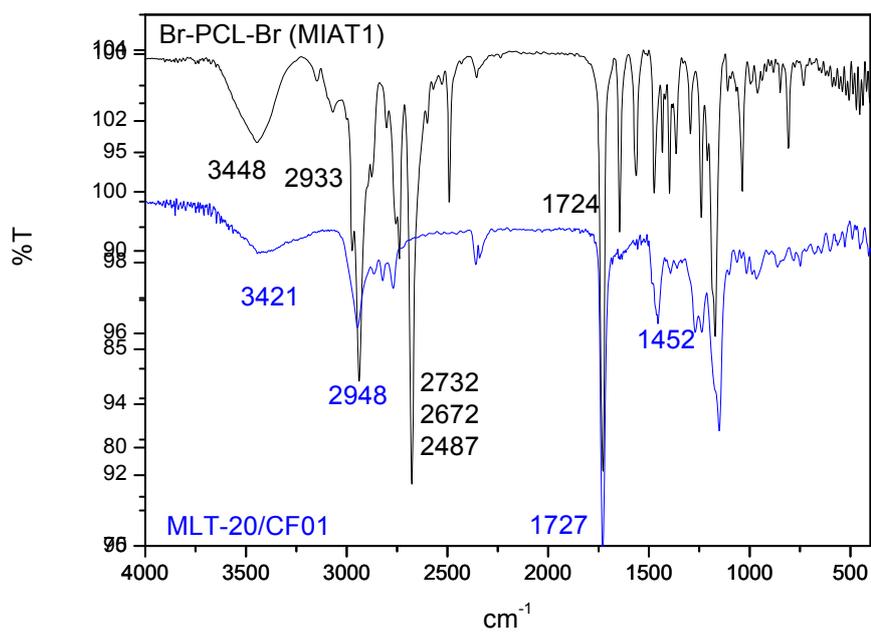


Figura 21. Infravermelhos de MLT-20/CF01 e de seu macroiniciador MIAT1.

No infravermelho de MLT20/CF01 temos o sinal em 1727cm^{-1} o sinal de C=O de éster e em 1245cm^{-1} a ligação –C-N-.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio é apresentado na Figura 22.

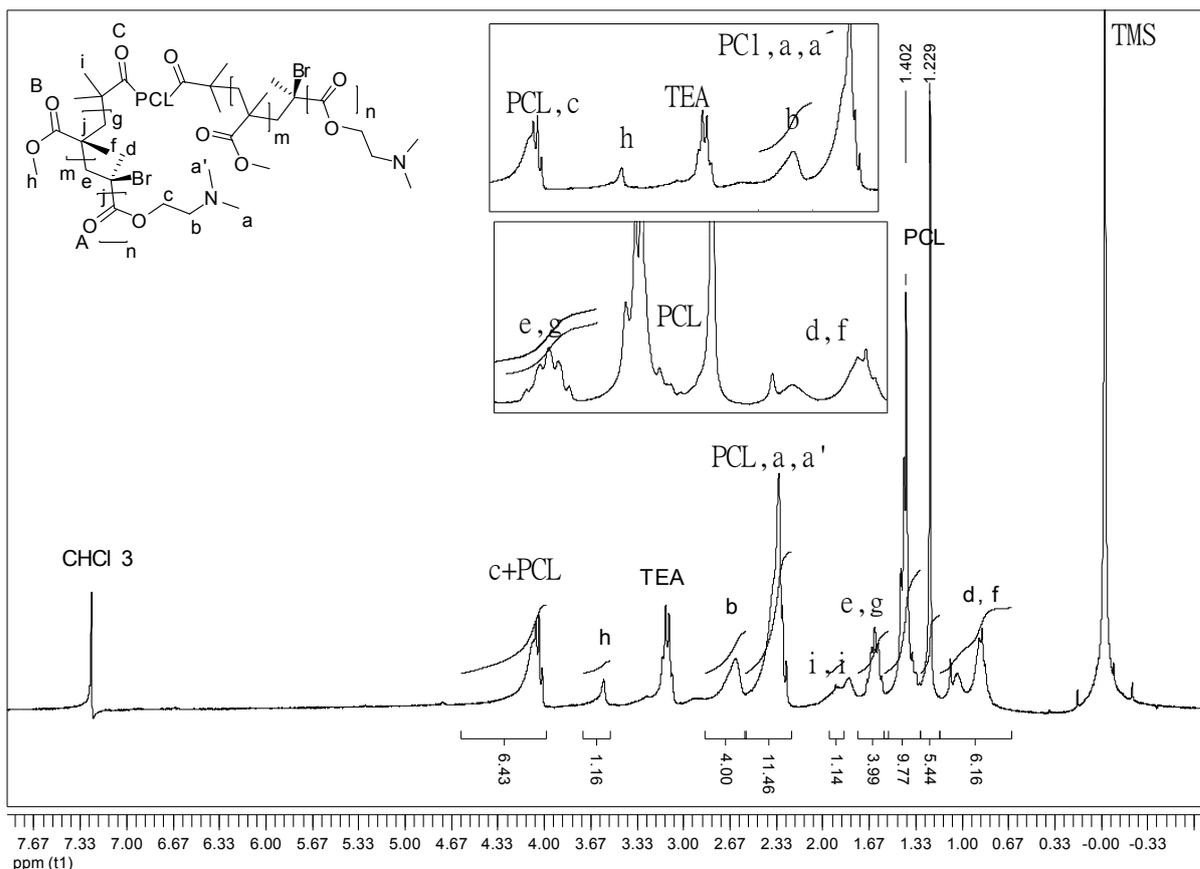


Figura 22. Espectro de RMN ^1H de MLT-20/CF01 (CDCl_3 , 300 MHz).

No espectro de RMN ^1H de MLT-20/CF01 encontramos em 1,0 ppm os hidrogênios identificados por *d* e *f* de DMAEMA e MMA correspondendo a 6 H. Em 1,2 e 1,4 ppm temos singletos de PCL (6H e 10H, respectivamente), em 1,6 ppm os hidrogênios *e* e *g* de $-\text{CH}_2-$ (integração = 4H), 1,9 ppm temos o 1H_{*i*},*i*' em 2,4 ppm temos um singlete conjugado dos hidrogênios de PCL e dos grupos $-\text{CH}_3$ ligados a amina do DMAEMA (*a*, *a*') cuja integral foi 12H. Em 2,7 ppm há a presença do hidrogênio de $-\text{CH}_2$ ligado a amina do DMAEMA (*b*) cuja integral foi 4 H, em 3,6 ppm o singlete de hidrogênio de $-\text{CH}_3$ ligado ao éster de MMA (*h*) com integral de 2 H devido a proporção empregada de MMA na reação e, por fim, 4,2 ppm singlete conjugado de hidrogênios de PCL e $-\text{COO}-\text{CH}_2-$ ligado ao éster de DMAEMA (*c*, integral = 6 H).

O material MLT-20/CF02 foi submetido à análise de GPC, a qual se encontra apresentada conforme a Figura 23.

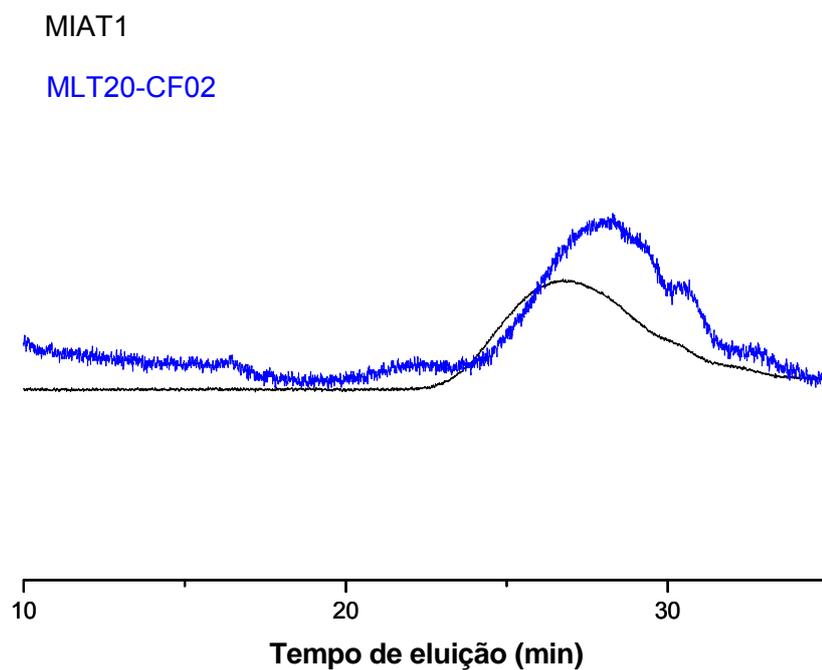


Figura 23. GPC de MLT-20/CF02 e macroiniciador (MIAT1).

O perfil de GPC de MLT-20/CF02 é semelhante ao obtido para MLT-20/CF01, obtendo-se $M_n = 12$ kDa, $M_w = 17$ kDa e $PDI = 1,41$.

Também foi realizada para esta amostra a análise de infravermelho (Figura 24).

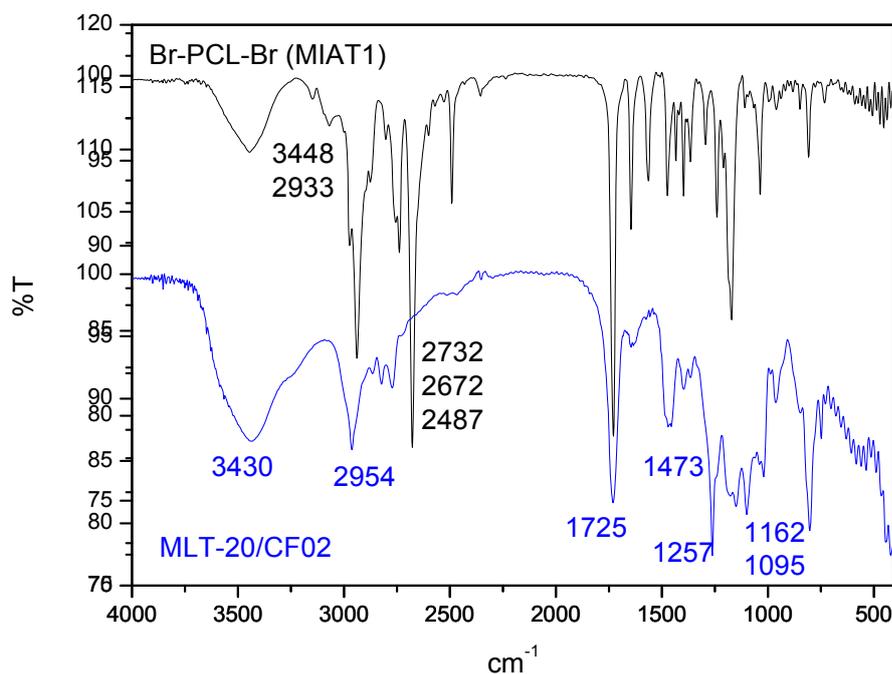


Figura 24. Espectro de infravermelho de MLT-20/CF02 com seu macroiniciador MIAT1.

Neste espectro observa-se em 1725 cm^{-1} sinal de -C=O em torno de 1095 cm^{-1} a ligação -C-N- .

No espectro de ressonância magnética de hidrogênio do produto MLT-20/CF02 observam-se a presença de todos os hidrogênios do copolímero com integrações semelhantes ao produto anterior, concluindo que se obteve o copolímero (Figura 25).

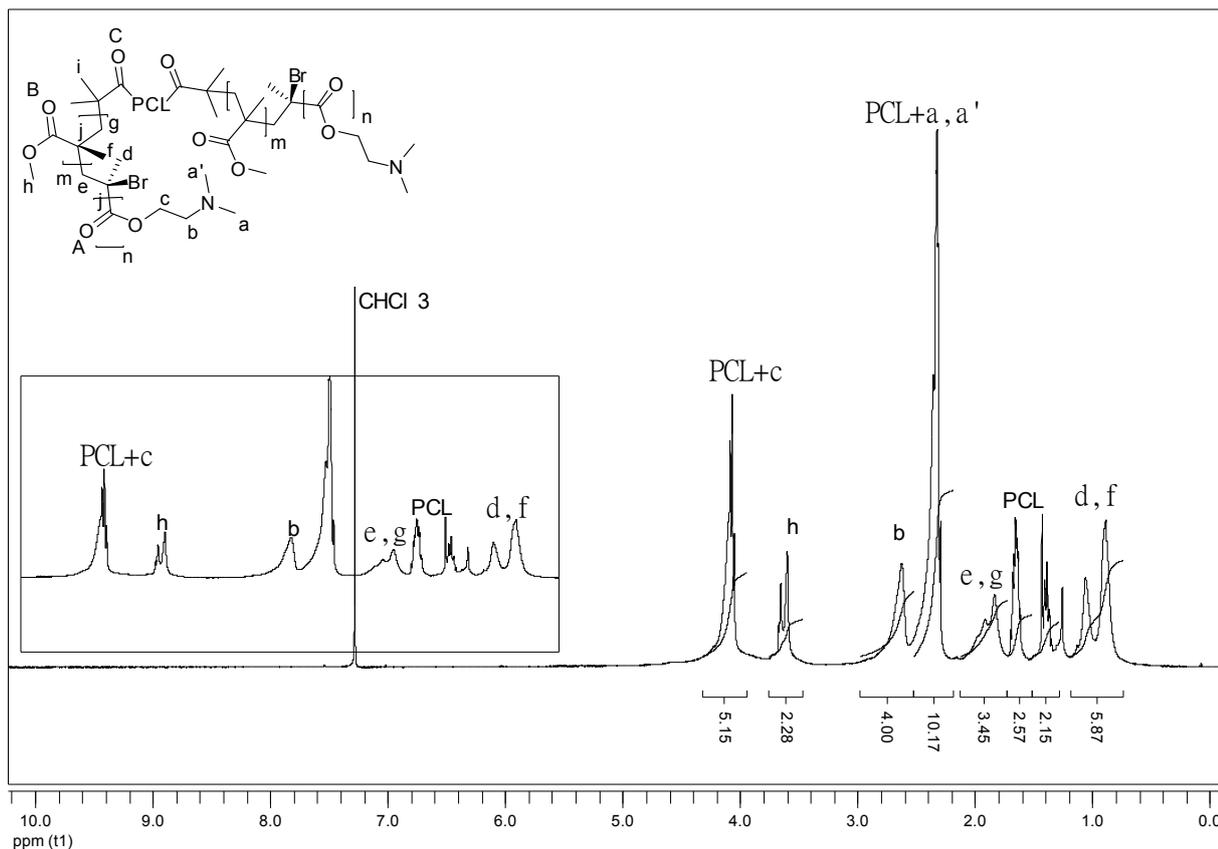


Figura 25: Espectro de RMN ^1H de MLT-20/CF02 (CDCl_3 , 300 MHz).

A reação para obtenção do produto MLT20/CF02 foi executada com maior temperatura e tempo de reação e permitiu a obtenção de produto com maior rendimento (64%).

4.1.6. Reação por método ATRP-ARGET:

O copolímero ARGET-A foi avaliado por IV, conforme os resultados apresentados na Figura 26.

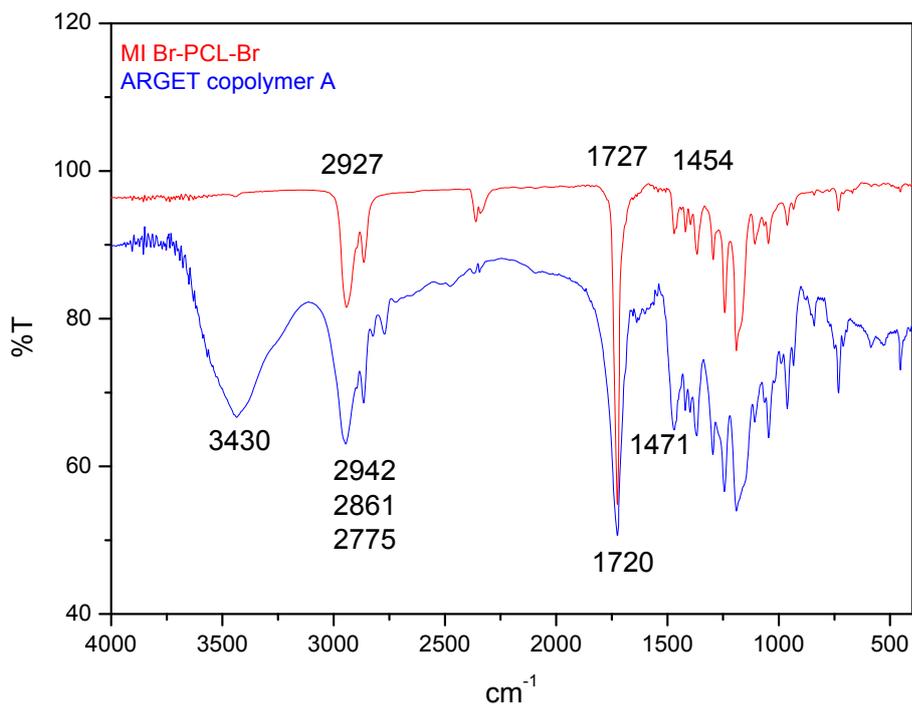


Figura 26. Espectro de infravermelho do copolímero ARGET-A e de seu macroiniciador (MIT2).

Segundo o espectro de infravermelho, ARGET-A apresenta em 3430 cm^{-1} representativos de ligação O-H, em 2940 e 2860 cm^{-1} ligação -C-H e, em 1720 cm^{-1} o sinal de -C=O.

A análise de GPC do produto ARGET-A teve $M_n = 4,4 \text{ kDa}$, $M_w = 20,6 \text{ kDa}$ e $PDI = 4,6$, apresentando um perfil com discretas subpopulações e, pequeno deslocamento, conforme a curva abaixo (Figura 27).

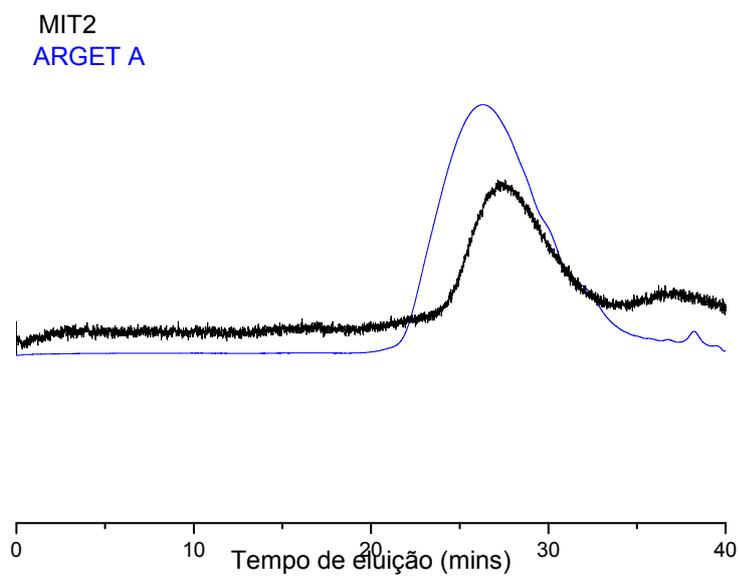


Figura 27. Espectro de GPC do copolímero ARGET-A e seu macroiniciador (MIT2).

O espectro de RMN ^1H do produto ARGET-A está apresentado na Figura 28, conforme segue, corroborando com os resultados anteriores.

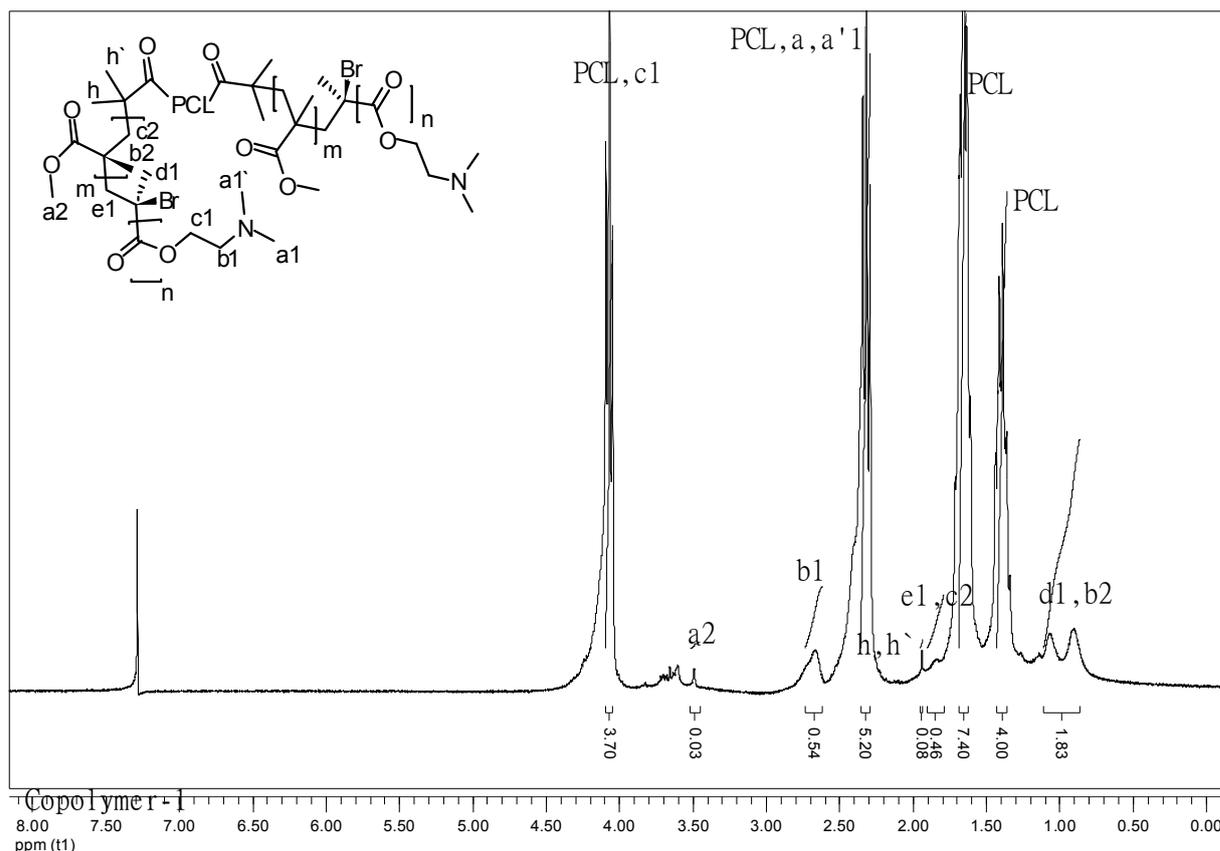


Figura 28. Espectro de RMN ^1H do copolímero ARGET-A (T2) (CDCl_3 , 300 Hz).

O tratamento 2 (T2, solubilização em metanol e precipitação repetida em ciclohexano, sendo seco sob vácuo durante 6 horas) eliminou os sinais de hidrogênios de etilhexanoato de estanho e anisol do produto T1 (espectro não demonstrado).

ARGET-A (T2) demonstra em 1,0 ppm um singlete referente a $2\text{H}_{d1,b2}$, em 1,4 ppm há um multiplete de hidrogênios de PCL (4H), em 1,7 ppm outro multiplete que conjuga hidrogênios provenientes de PCL (8H). Em 2,0 ppm ocorre um singlete alargado correspondente a $\text{H}_{e1,c2}$, cuja integração foi 1 hidrogênios. Em 1,94 ppm temos 1 H de h,h' , em 2,3 ppm um multiplete que sobrepõe $\text{H}_a, a'1'$ e PCL (6H), em 2,7 ppm um singlete que representa 1H_{b1} . Ainda, em 3,7 ppm há um multiplete de 1H de H_a2 , 4,2 ppm um tripleto correspondente a hidrogênios de PCL e H_{c1} (4H). Também se pode observar ausência de sinais de monômeros em 5,2 e 5,8 ppm.

A composição do copolímero denominado ARGET-A foi calculada com base nos sinais de PCL em 1,35 ppm ($4,00\text{H}_a$), DMAEMA em 2,63 ppm ($0,54\text{H}_{b1}$) e MMA

em 3,46 ppm ($0,03H_{a2}$), resultando em 67 unidades de CL:6 unidades de DMAEMA e 0,12 unidades de MMA no tribloco (93% DMAEMA:7% MMA).

O tratamento 2 (T2) do copolímero ARGET-A, ao comparar ao macroiniciador (MIT2), observamos a redução no sinal de 1,9 ppm (integração varia de 0,19 no macroiniciador para 0,08 no copolímero ao integrar 1,36 ppm com 4Ha de PCL) demonstrando que, provavelmente, o tratamento com metanol tenha acarretado em perda de funcionalidade da extremidade bromada (integração apresentada em ANEXOS).

A seguir, o espectro de RMN ^{13}C do copolímero ARGET-A para confirmação do resultado (Figura 29).

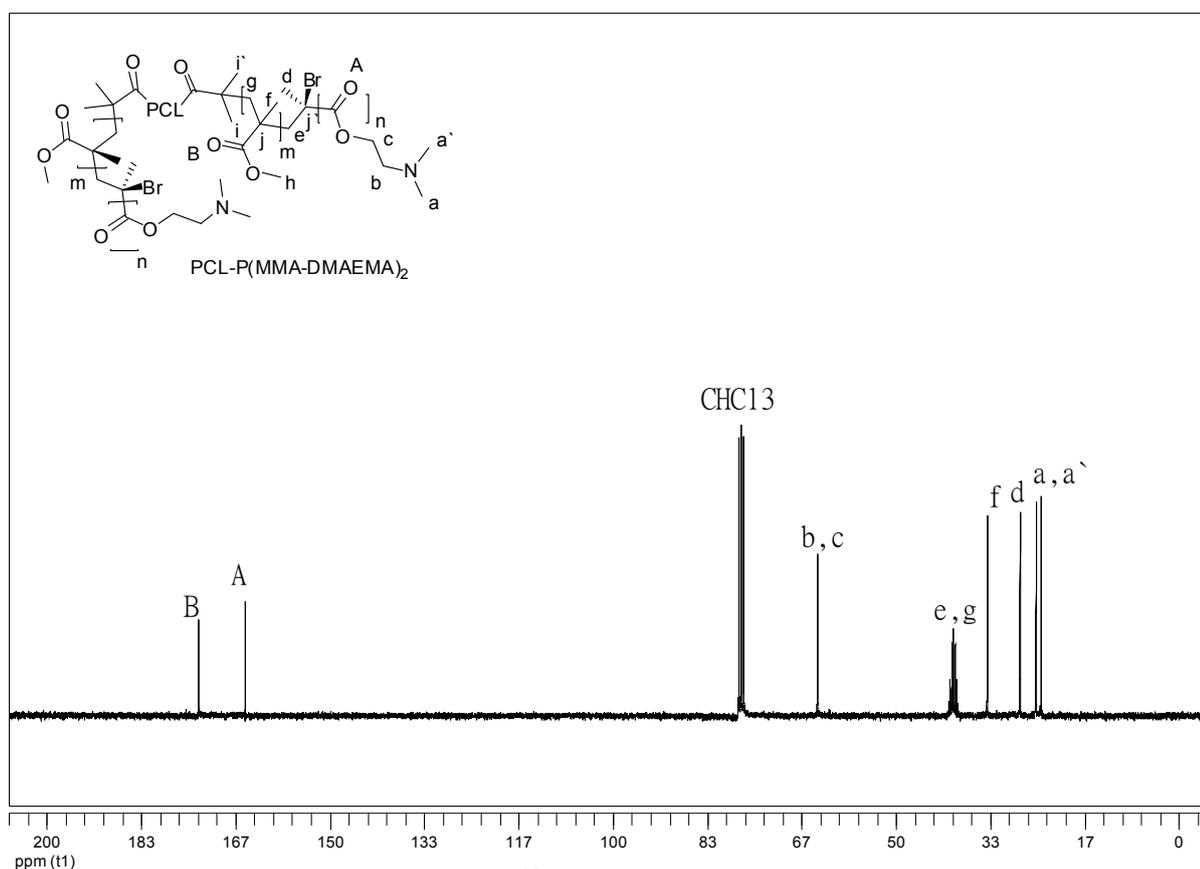


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C do copolímero ARGET-A ($CDCl_3$, 300 MHz).

No espectro acima se observam os sinais dos carbonos do MMA (f) em 33,5 ppm e DMAEMA (a, a', b, c), não foram identificados sinais da PCL. Observa-se também a presença das carbonilas de MMA e DMAEMA em 164 e 172 ppm.

Com o decorrer da pesquisa, foi necessário realizar uma otimização do copolímero ARGET-A, reduzindo-se a concentração de MMA na síntese, passando a denominar copolímero ARGET-B.

O espectro de infravermelho da Figura 30 mostra o produto ARGET-B, destacando em 3403 cm^{-1} a banda O-H, 2935 and 2857 cm^{-1} há a ligação -C-H e, em 1720 cm^{-1} está localizado o grupo carbonila.

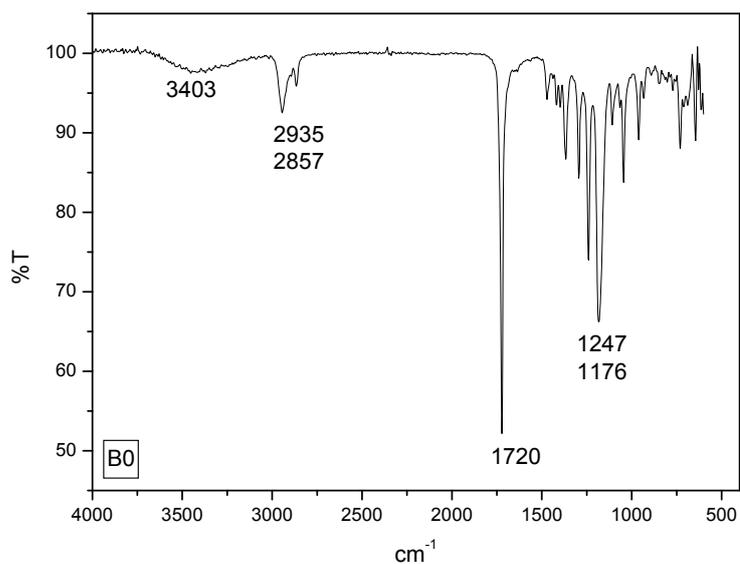


Figura 30. Infravermelho do copolímero ARGET-B.

A avaliação do GPC deste produto não foi realizada. O espectro de ressonância magnética de hidrogênio é apresentado a seguir (Figura 31).

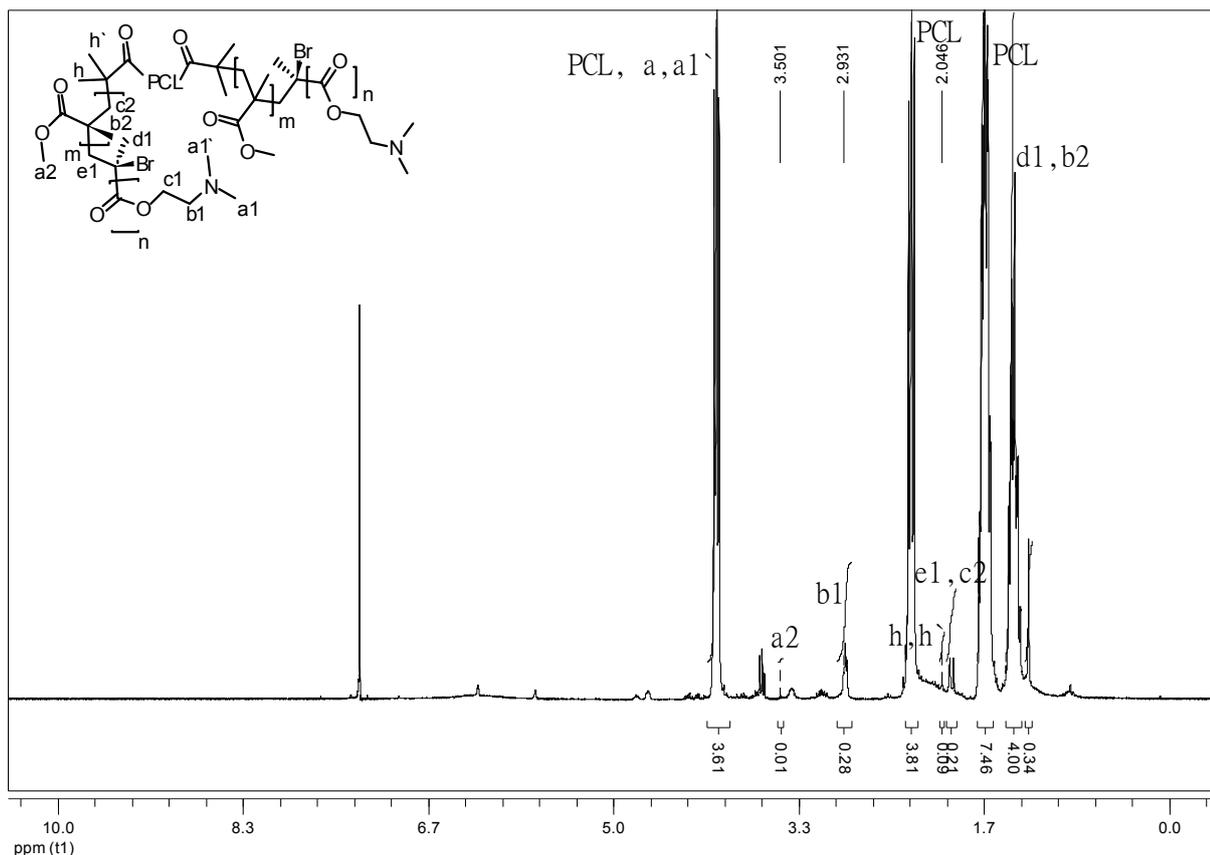


Figura 31. RMN ^1H do copolímero ARGET-B (CDCl_3 , 300 MHz).

Podem-se observar o sinal em 1,23 ppm na forma de singlete correspondente a sinais dos hidrogênios *d1* e *b2* (1H). Em 1,36 ppm há um multiplete dos hidrogênios de PCL (4H). Em 1,63 ppm temos hidrogênios de PCL sob forma de um multiplete (8H), em 1,97 ppm temos *He1* e *Hc2*, equivalendo a 1H e em 2,02 ppm há um singlete correspondente aos hidrogênios da funcionalização (*1Hh, h'*). Em 2,29 ppm temos os multiplete de hidrogênios de PCL e hidrogênios *a, a1'* de DMAEMA (4H). Em 2,93 ppm saem os 4 hidrogênios de *Hb1* do DMAEMA na forma de multiplete. Em 3,50 ppm há um singlete correspondente a *Ha2* (1H) do MMA e em 4,05 ppm um triplete referente a hidrogênios de PCL e hidrogênio *c1* de DMAEMA (4H). A reação apresentou rendimento de 30% (mol). Ao comparar os sinais de 1,35 ppm de PCL, 2,8 ppm de DMAEMA e 3,6 ppm de MMA, calculou-se a massa relativa do copolímero ARGET-B, obtendo-se em torno de 20 kDa.

4.1.7. Resultados do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA) $_2$ funcionalizado com LDV:

4.1.7.1. Resultado da proteção do grupo ácido da valina:

A L-valina sofreu esterificação em presença de cloreto de tionila e metanol, gerando a forma cloridrato do éster metílico de valina.

O espectro de infravermelho do produto de partida (L-ValOH) e do produto esterificado (L-Val(OMe)) são mostrados na Figura 32.

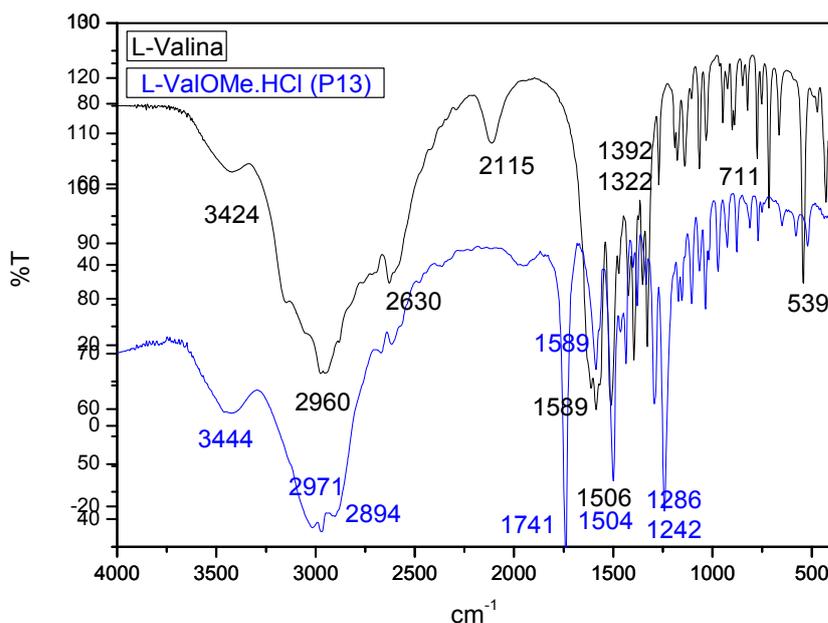


Figura 32. Espectro de infravermelho de L-valina e cloridrato do éster metílico de L-valina.

O aminoácido de partida apresentou em 3424 a 2225 cm^{-1} uma banda forte e alargada que representa a sobreposição de bandas de deformação axial das ligações N-H e O-H das extremidades do aminoácido, em 2115 cm^{-1} ocorre a combinação das vibrações de deformação angular assimétrica e da oscilação de torção do grupo NH_3^+ , sendo que esta última também ocorre em torno de 500 cm^{-1} , podendo ser observada somente quando o nitrogênio não estiver substituído.

O produto da esterificação apresenta em 3444 cm^{-1} ligação N-H, 2894 cm^{-1} sinal referente à metila de extremidade, surgimento do sinal em 1741 cm^{-1} da carbonila de éster de α -aminoácidos, obtendo o composto esterificado.

O RMN ^1H da L-valina é apresentado em anexos e o do éster metílico da L-valina segue na Figura 33.

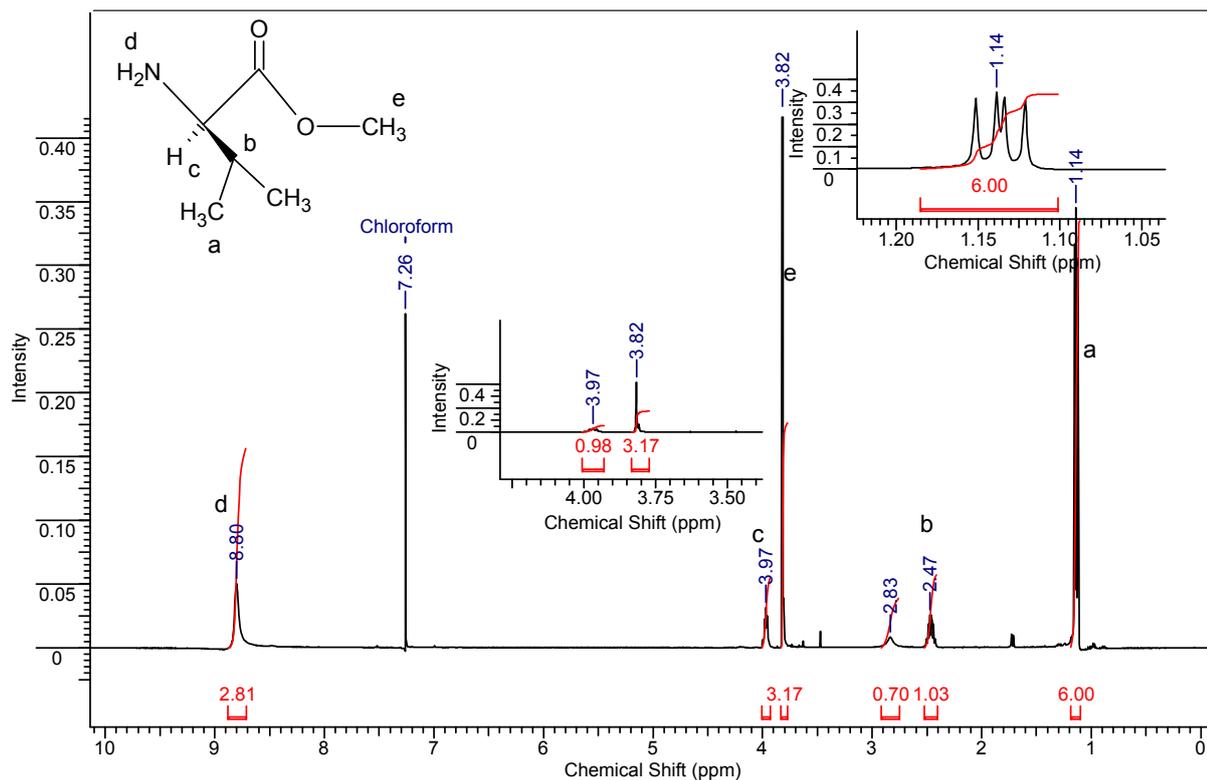


Figura 33. Espectro de RMN ^1H do cloridrato do éster metílico de valina (CDCl_3 , 300 MHz).

O espectro do cloridrato do éster metílico de L-valina demonstra a presença em 3,82 ppm referente a um singlete de 3H, o qual caracteriza a esterificação da molécula ter sido efetiva.

4.1.7.2. Resultados dos dipeptídeos obtidos com diferentes grupos protetores:

Foram obtidos dois dipeptídeos: BocAsp(OBn)Val(OMe) e FmocAsp(OtBu)Val(OMe). O dipeptídeo BocAsp(OBn)Val(OMe) foi analisado por infravermelho em comparação com o aminoácido de partida (BocAsp(OBn)OH), sendo apresentados na Figura 34.

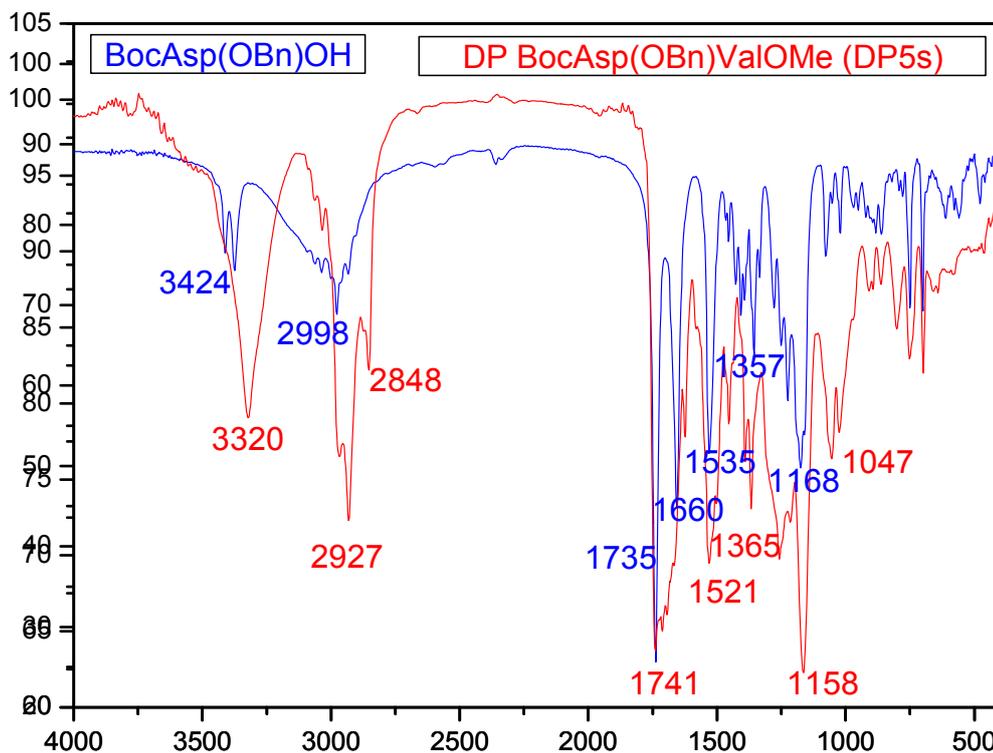


Figura 34. Espectro de infravermelho de BocAsp(OBn)OH e BocAsp(OBn)Val(OMe).

O aminoácido BocAsp(OBn)OH apresenta em 3424 cm^{-1} a ligação N-H, em 2998 cm^{-1} a banda de C-H. Em 1735 cm^{-1} ocorre a banda de carbonila de éster da cadeia lateral, em 1660 cm^{-1} e 1535 cm^{-1} correspondem a banda de amida presente no grupo Boc.

O produto apresentou banda de 3320 cm^{-1} com mudança de perfil (ombro) que representa ligação N-H de amida e/ou de carbamato, ou presença de umidade. Em 1741 cm^{-1} ocorre a carbonila de éster sobreposta a carbonila de carbamato e, de amida da ligação peptídica devido ao alargamento do sinal e, em 1521 cm^{-1} sinal de C=C do grupo benzila.

A seguir, tem-se o espectro de RNM ^1H do dipeptídeo BocAsp(OBn)Val(OMe) (Figura 35).

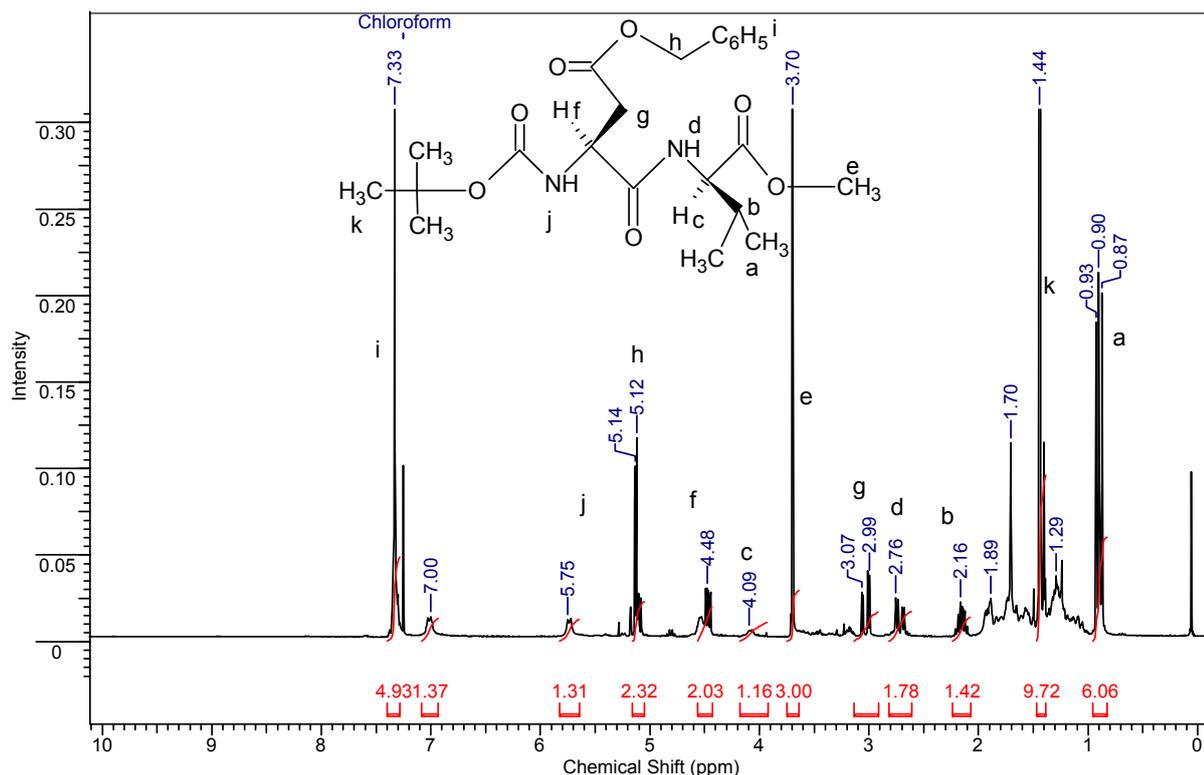


Figura 35. Espectro de RMN ^1H do dipeptídeo BocAsp(OBn)Val(OMe) (CDCl_3 , 300 MHz).

O espectro de RMN ^1H apresenta em 0,90 ppm um duplo dupletto correspondente aos acoplamentos $^3J_{\text{H}_a-\text{H}_b} = 7,05$ Hz das metilas da valina, em 1,44 ppm observa-se um singletto com integração de 9 H_k do grupo Boc, em 2,16 ppm ocorre um multipletto de 1H_b, o duplo dupletto centrado em 2,76 ppm refere-se a 1H_d cujo $^3J_{\text{H}_d-\text{H}_c} = 6,45$ Hz e em 3,07 ppm outro duplo dupletto correspondente a 2H_g com $^3J_{\text{H}_g-\text{H}_f} = 4,70$ Hz (integral = 1,72). Em 3,70 ppm observa-se um singletto correspondente a 3H_e, em 4,09 ppm temos 1H_c, em 4,46 ppm ocorre um multipletto referente a 1H_f em acoplamento com 2 H_g e 1 H_j ($^3J = 4,70$ e $8,22$ Hz), em 5,12 ppm tem-se dois dubletos dos hidrogênios benzílicos (H_h) acoplando com 2H_i ($^3J_{\text{H}_h-\text{H}_i} = 7,06$ e $4,69$ Hz) e, por fim, em 5,75 e 7,00 ppm observam-se dubletos referentes ao H_j cujo $^3J_{\text{H}_j-\text{H}_f} = 8,22$ Hz, ambos. Os hidrogênios aromáticos aparecem em 7,33 ppm sobrepostos entre si na forma de um singletto alargado cuja integral foi 5H_i. Em 1,3, 1,7 e 1,9 ppm ocorrem sinais de diciohexilurea (DCU) formando na reação. Observando a integração, percebe-se a ocorrência de 1 hidrogênio em excesso o qual aparece em 4,46 ppm que é proveniente do BocAsp(OBn)OH (produto de partida).

O outro dipeptídeo sintetizado foi o FmocAsp(OtBu)ValOMe, sendo avaliado por análise de infravermelho, conforme abaixo (Figura 36).

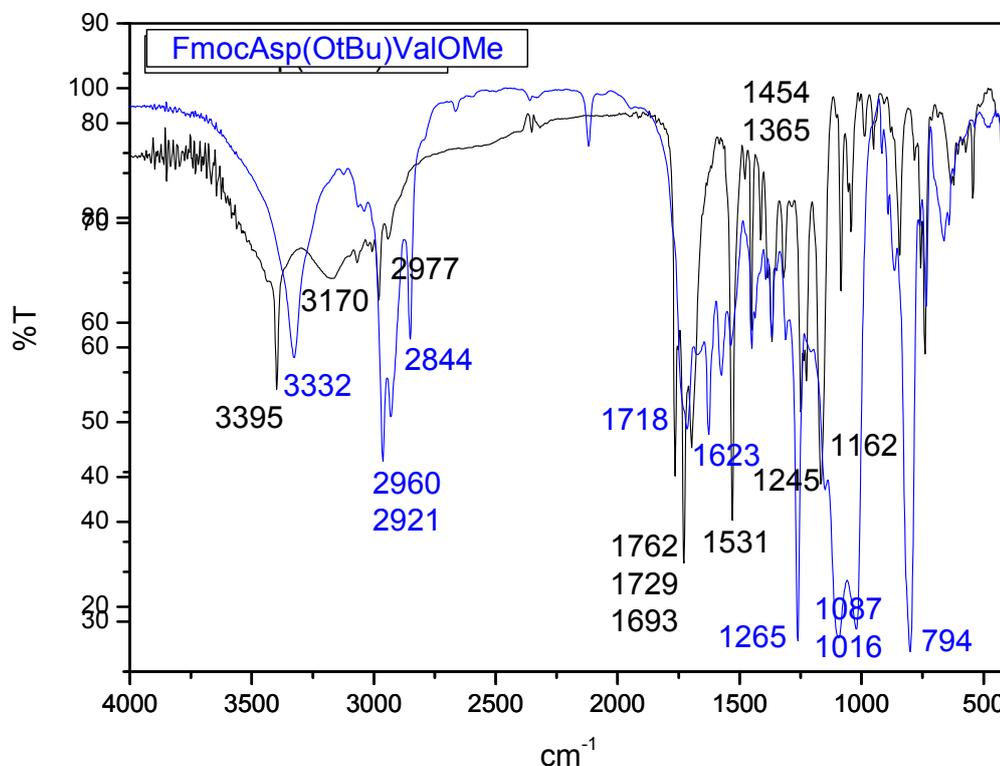


Figura 36. Espectros de infravermelho do aminoácido FmocAsp(OtBu)OH (linha preta) e dipeptídeo FmocAsp(OtBu)Val(OMe) (linha azul).

O aminoácido FmocAsp(OtBu)OH apresenta banda em 3395 cm⁻¹ de ligação N-H e até 2900 cm⁻¹ banda alargada de OH. Em 1762 cm⁻¹ ocorre a vibração da carbonila de éster, seguido de 1729 cm⁻¹ da carbonila de ácido carboxílico e, em 1693 cm⁻¹ da carbonila de amida. Em 1531 cm⁻¹ a ligações C=C dos anéis aromáticos do grupamento Fmoc, em torno de 1400 cm⁻¹ ocorrem deformações C-H de terc-butilas e em 1245 cm⁻¹ a ligação -C-O-.

O dipeptídeo FmocAsp(OtBu)ValOMe apresenta em 3332 cm⁻¹ a ligação N-H, em 2900 cm⁻¹ a ligação C-H, em 1623 cm⁻¹ ocorre a ligação C=C do grupamento Fmoc, em 1720 cm⁻¹ a presença de carbonila de amida e em 1245 cm⁻¹ ocorre ligação C=C de aromáticos.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do dipeptídeo FmocAsp(OtBu)Val(OMe) é apresentado na Figura 37.

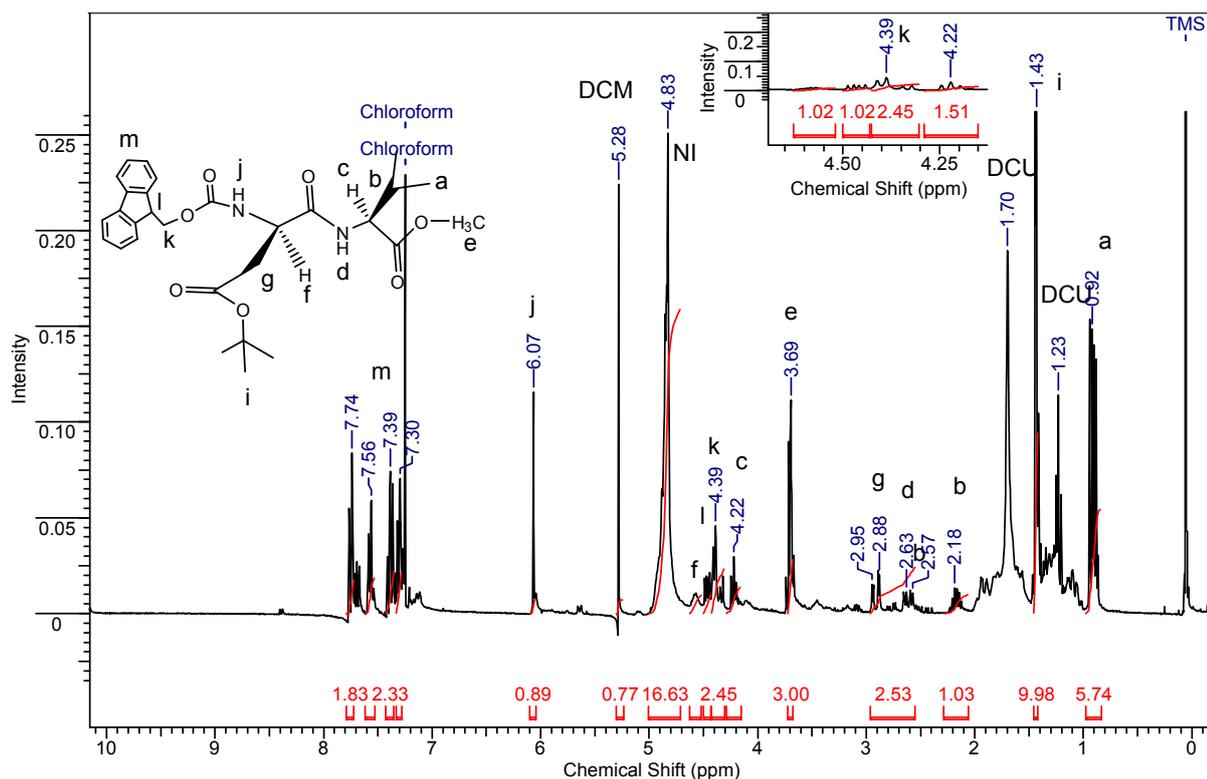


Figura 37. Espectro de RMN ^1H de FmocAsp(OtBu)Val(OMe) (CDCl_3 , 300 MHz).

O espectro do dipeptídeo FmocAsp(OtBu)Val(OMe) em 0,92 ppm dois dubletos referentes ao acoplamento a 6Ha ($^3J_{\text{Ha-Hb}} = 7,04$ Hz), em 1,43 ppm ocorre um singleto referente a 9Hi do terc-butil, em 2,18 ppm ocorre um multipletto referente ao 1Hb e em 2,6 ppm observa-se dois dubletos correspondentes a 1Hd mostrando o acoplamento a $^3J_{\text{Hd-Hc}} = 7,40$ Hz e de 2Hg com com acoplamento de $^3J_{\text{Hg-Hf}} = 4,11$ Hz. Em 4,22 ppm há um triplete de 1Hc ($^3J_{\text{Hc-Hb}} = 7,04$ Hz), em 4,39 ppm ocorre um duplo dubletto de 2Hk ($^3J_{\text{Hk-Hl}} = 7,04$ Hz), em 4,46 ppm há multipletto referente a 1Hl e em 4,57 ppm temos um singleto de 1Hf. Em 3,69 ppm observa-se singletos sobrepostos referente a 3He, em 4,83 ppm aparece não-identificado. Em 6,07 ppm há um singleto referente a 1Hj e de 7,30 a 7,74 ppm aparecem os hidrogênios conjugados do grupamento Fmoc totalizando 8 hidrogênios.

4.1.7.3. Desproteção do grupamento Boc do dipeptídeo:

A desproteção do grupamento Boc do dipeptídeo Boc-Asp(OBn)Val(OMe) foi realizada em meio ácido, o qual foi avaliado somente por ressonância magnética nuclear de hidrogênios (Figura 38).

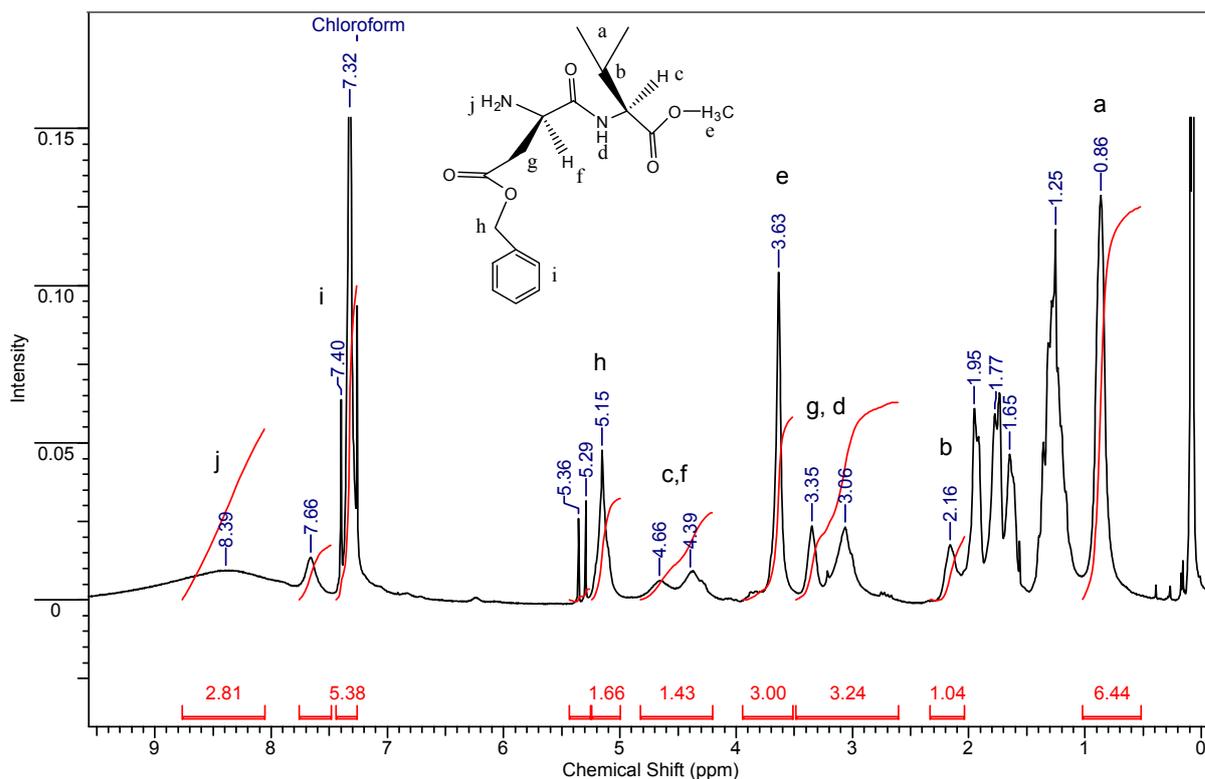


Figura 38. Resultado de RMN ^1H da desproteção de BocAsp(OBn)Val(OMe) (método A, CDCl_3 , 300 MHz).

O espectro do produto da desproteção do dipeptídeo BocAsp(OBn)Val(OMe) demonstra-se em a ausência de hidrogênios do grupamento Boc em 1,45 ppm, confirmando a retirada do grupamento Boc.

4.1.7.4. Desproteção do grupamento Fmoc do dipeptídeo:

A reação de desproteção para o dipeptídeo FmocAsp(OtBu)Val(OMe) foi realizada inicialmente com piperidina, sendo purificado segundo a metodologia de Carpino (1972). O resultado de RMN ^1H segue (Figura 39).

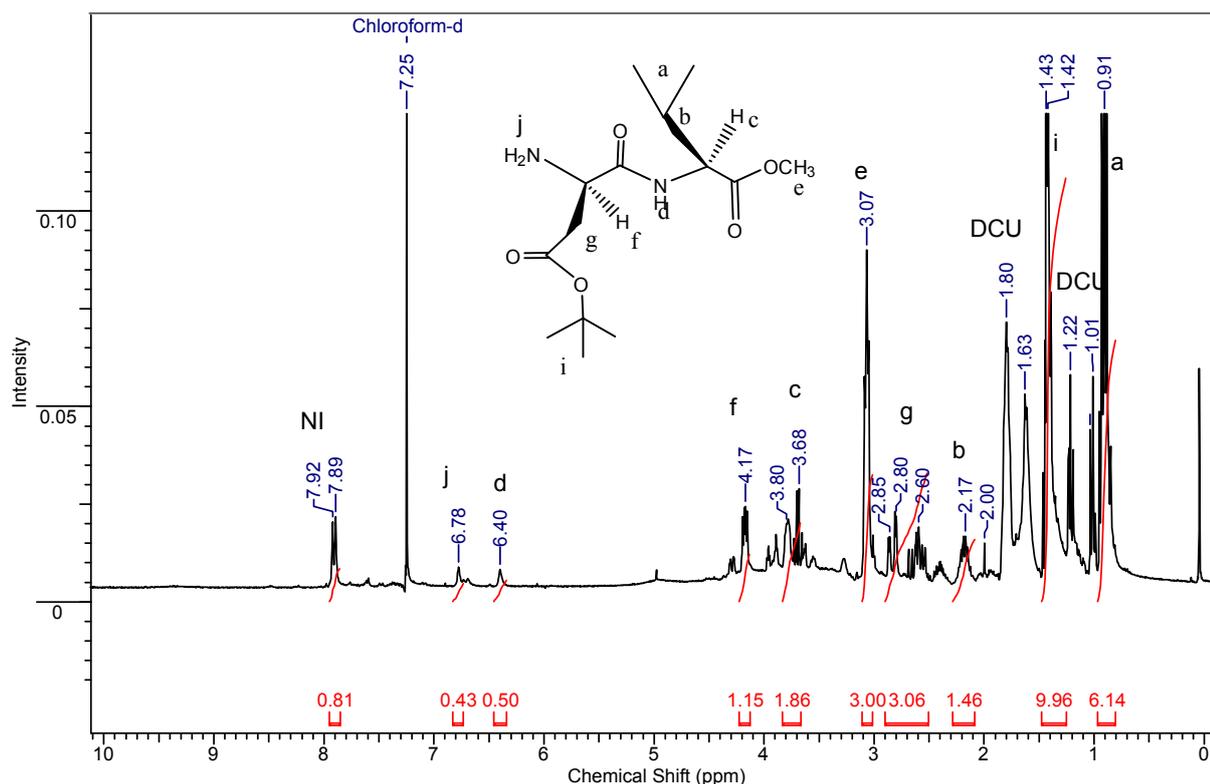


Figura 39. Resultados do produto de desproteção do grupamento Fmoc do dipeptídeo FmocAsp(OtBu)Val(OMe), após o tratamento de purificação (CDCl_3 , 300 MHz).

No espectro de RMN de hidrogênio do produto, que houve o desaparecimento dos sinais de hidrogênios do grupamento Fmoc em δ 7,9 ppm. Nesta região ocorre um dubleto não identificado correspondendo a integral de 1H, provavelmente de impureza da reação.

4.1.7.5. Resultados das reações com IEM:

a) Resultado esterificação metílica do tripeptídeo LDV:

Visando a ligação do IEM ao tripeptídeo LDV, é necessária uma etapa reacional anterior que compreende a proteção dos grupamentos ácidos ($-\text{COOH}$) presentes na extremidade da valina e na cadeia lateral do ácido aspártico do LDV. Essa proteção foi realizada expondo o LDV adquirido comercialmente ao cloreto de tionila em metanol. Abaixo segue a caracterização por infravermelho do tripeptídeo LDV e do produto esterificado (Figura 40).

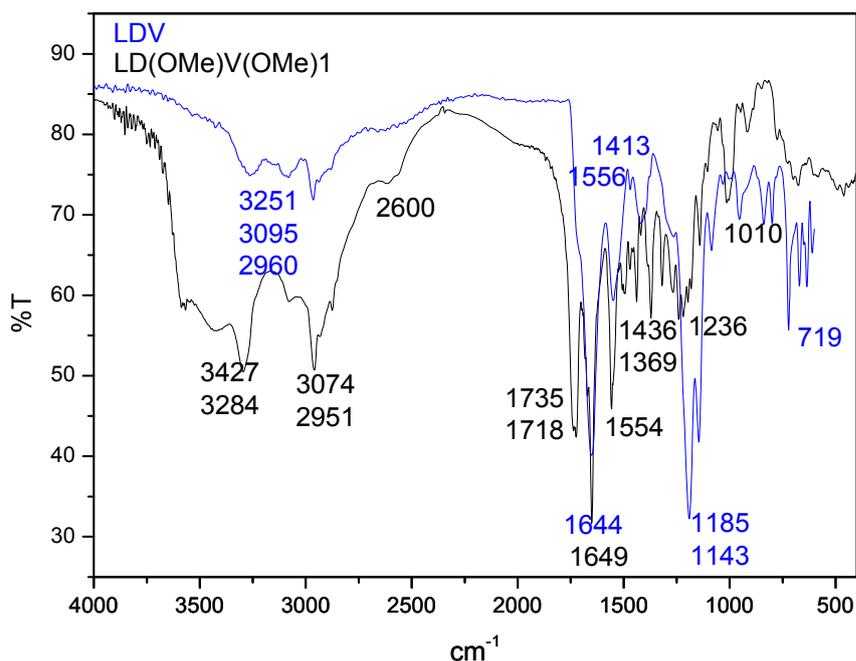


Figura 40. Infravermelho do LDV e LD(OMe)V(OMe).

O espectro de infravermelho do tripeptídeo LDV mostra entre 3300 e 2950 cm⁻¹ banda alargada de ligação N-H, em 1644 e 1556 cm⁻¹ temos a banda dos grupamentos carboxilato (-COO-), confirmado pela banda de menor intensidade em 1413 cm⁻¹ e em 1200 a 1100 cm⁻¹ temos o sinal de ligação -C-C(=O)-O-.

Já o produto de reação LD(OMe)V(OMe) apresentou entre 3500 e 2500 as deformações axiais de N-H e C-H. Em 1735 e 1718 cm⁻¹ temos os sinais de carbonila de éster sobrepostos e em 1649 cm⁻¹ a banda de carbonila de amida.

O RMN ¹H do produto de partida (LDV) e do produto esterificado seguem abaixo (Figura 41).

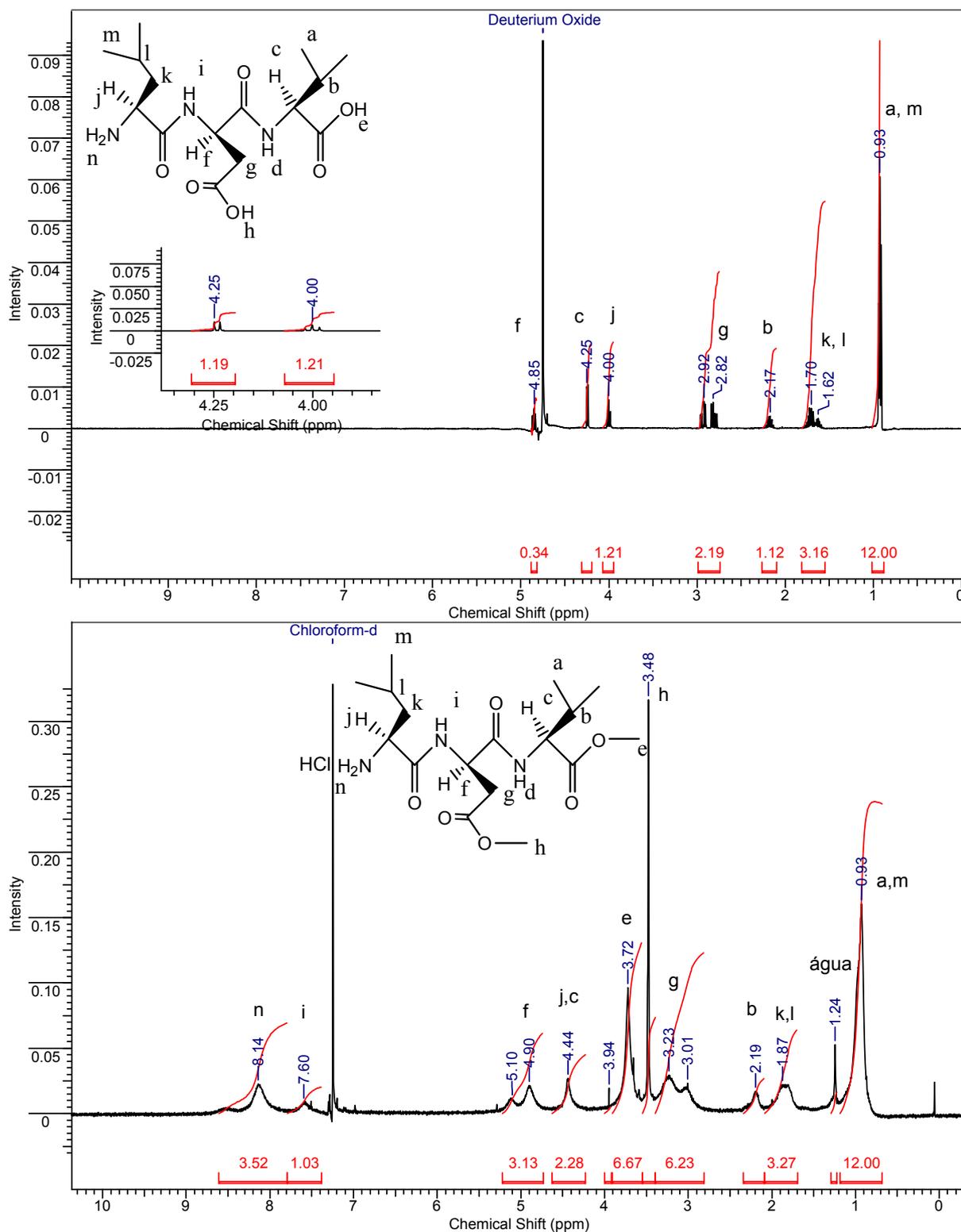


Figura 41. RMN ^1H de LDV (imagem superior) e LD(OMe)V(OMe) (imagem inferior, CDCl_3 , 300 MHz).

No espectro de hidrogênio do tripeptídeo LDV temos um multipeto em 0,93 ppm referente aos 12Ha+m, em 1,62 e 1,70 ppm sai outro multipeto correspondendo a 3 Hk+l. Em 2,17 ppm sai um multipeto de 1 Hb, em 2,82 e 2,92

ppm temos quadro dubletos referentes a 2 Hg ($^3J_{H_g-H_f} = 6,04$ Hz). Em 4,00 ppm ocorre um tripleto de 1 Hj que acopla com Hk a $^3J_{H_j-H_k} = 7,30$ Hz, em 4,25 ppm um dubleto referente a 1 Hc ($^3J_{H_c-H_b} = 5,79$ Hz) e em 4,85 ppm um quarteto correspondente a 1 Hf ($^3J_{H_f-H_g} = 6,04$ Hz).

Já no espectro do produto esterificado (LD(OMe)V(OMe)), temos um multiplete em 0,93 ppm referente a 12Ha+m, em 1,24 ppm um singleto de um hidrogênio, possivelmente umidade (água), 1,87 ppm há um singleto referente a 3 H, sendo 2Hk+1Hl da leucina e em 2,19 ppm outro singleto correspondendo a 1 Hb. Em 3,23 ppm há um singleto com integral de 6H, destes, dois hidrogênios correspondem ao 2Hg e os demais não foram identificados. Em 3,48 ppm temos um singleto intenso correspondendo aos 3 Hh da esterificação. Em 3,72 ppm temos outro singleto correspondendo a 6 H, destes 3He, sendo que os demais não puderam ser identificados. Em 4,44 ppm há um singleto referente a 2H, sendo 1Hj e 1 Hc, em 4,90 ppm outro singleto referente a 1 Hf (integral =3,13), em 7,60 ppm ocorre um singleto identificado por 1 Hi e em 8,14 ppm um singleto de 3H, sendo 2Hn e o 1H do cloridrato. É possível que tenha restado algumas moléculas de LDV que não foram esterificadas devido aos hidrogênios em excesso nos deslocamentos de 3,23, 3,72 e 4,90 ppm (4H, 3H e 2 H, respectivamente).

b) Resultado da síntese do IEM-LD(OMe)V(OMe):

Partindo-se do produto anterior, LD(OMe)V(OMe), o qual reagiu-se com o IEM, obteve-se por infravermelho, os sinais de 3412 a 2800 cm^{-1} que correspondem as ligações C-H e N-H, em 1720 cm^{-1} temos o sinal da carbonila de éster e em 1631 cm^{-1} a carbonila de amida e uréia (-NH(C=O)-NH-). Entre 1454 e 1377 cm^{-1} temos o sinal de ligação -C-N-, de 1300 a 1100 cm^{-1} ocorrem as vibrações de carboxilato (C(C=O)O) e, abaixo de 1000 cm^{-1} os sinais de N-H e C-N (Figura 42).

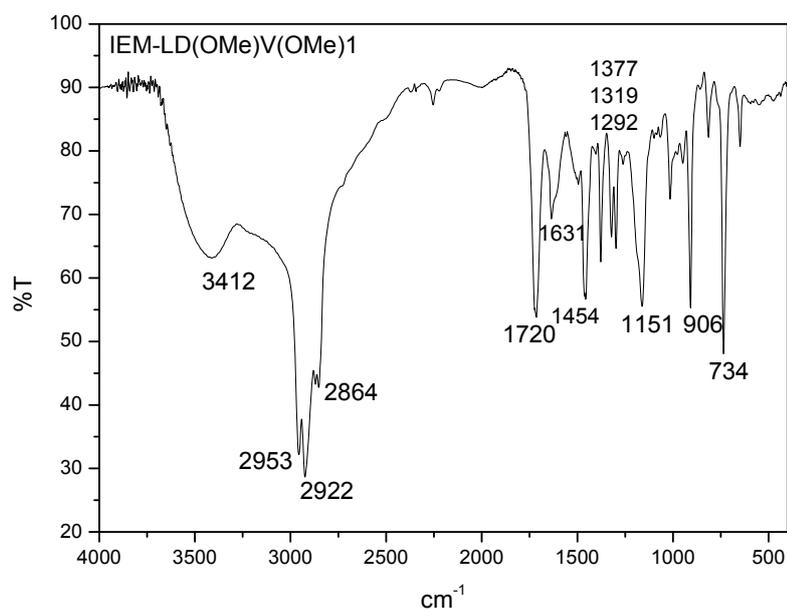


Figura 42. Infravermelho do produto IEM-LD(OMe)V(OMe).

E, a seguir apresentamos o espectro de RMN ^1H IEM-LD(OMe)V(OMe) na Figura 43.

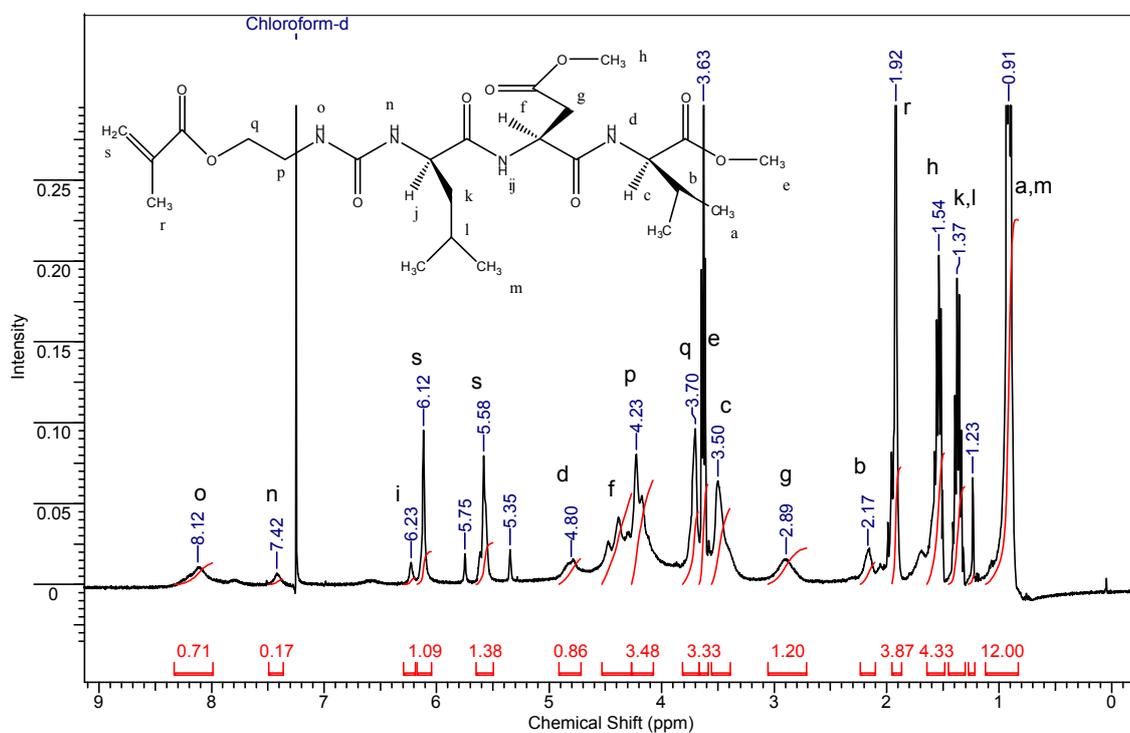


Figura 43. Espectro de RMN ^1H do produto IEM-LD(OMe)V(OMe) (300 MHz, CDCl_3).

Pode-se observar em 0,91 ppm os sinais sobrepostos dos hidrogênios correspondentes a Ha+Hm, totalizando 12 H, sob forma de um tripleto $^3J_{\text{Ha-Hb/Hm-Hl}} = 7,30$ Hz. Em 1,23 ppm há o sinal de água (umidade da amostra), em 1,37 ppm um multipletto identificado por 1Hk+1Hl, em 1,54 ppm ocorre outro multipletto referente a 3 Hh e em 1,92 ppm um singletto dos 3Hr do IEM. Em 2,17 ppm temos um singletto de 1 Hb e em 2,89 ppm outro singletto de 2 Hg. Em 3,50 ppm ocorre um singletto referente a 1 Hc, em 3,63 ppm um tripleto de 3 He, cujo $^3J = 6,55$ Hz, entretanto, não foi possível identificar quais hidrogênios encontram-se em acoplamento. Em 3,70 ppm temos outro singletto referente a 2 Hq e em 4,23 ppm um multipletto de 2 H p e 1 Hf. Em 4,80 ppm sai o sinal de 1Hd, em 5,58 e 6,12 ppm temos os dois singletos referentes aos Hs do IEM e, por fim, em 7,42 e 8,12 ppm os dois singletos dos hidrogênios 1Hn e 1Ho, respectivamente. Confirma-se assim a obtenção do produto desejado.

c) Resultado do acoplamento do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ ao IEM-LD(OMe)V(OMe) por ARGET-ATRP:

O produto da reação (adaptado da metodologia de Ayres (2005)) foi avaliado somente por RMN ¹H (Figura 44), onde apresentou no espectro os sinais de um singletto em 0,91 ppm equivalente a 1 Hd_{1,b2} do copolímero (DMAEMA e MMA, respectivamente), em 1,21 ppm temos um sinal com integral de 1H referente a umidade na amostra, em 1,36 ppm temos um multipletto referente a hidrogênios de PCL Ha, podendo estar sobrepostos a hidrogênios k e l da leucina. Em 1,62 ppm ocorre um multipletto com 8Hb,c de PCL, em 1,92 ppm temos um multipletto referente a 1H, identificado como Hr de IEM, em 1,98 ppm há o singletto da funcionalização (Hh,h') com integral de 0,17, o qual encontra-se levemente deslocado devido a presença de DMSO residual da reação. Em 2,14 ppm ocorre um singletto de 1Hb da valina, em 2,28 ppm saem 4H, sob forma de um tripleto, referentes a Hd de PCL ($^3J_{\text{Hd-Hc}}=7,63\text{Hz}$). Em 2,49 ppm temos um multipletto de 1Hb₁ do DMAEMA, em 2,94 ppm outro multipletto de 1Hg do ácido aspártico e, de 3,44 a 3,71 ppm saem multiplettos sobrepostos referentes a 4H, sendo 3He de valina e 1Hq de IEM. Em 4,03 ppm temos 4H sob forma de tripleto, referentes a PCLe ($^3J_{\text{He-Hb}}=6,46$ Hz), em 4,22 ppm um multipletto de 1Hp IEM, em 4,42 ppm 1Hf

(quiral) do ácido aspártico, em 4,77 ppm um multiplete de Hd (-NH-) da ligação peptídica entre ácido aspártico e valina, em 5,59 e 6,13 ppm saem sinais de 2Hs do IEM e em 7,51 ppm, um multiplete referente a 2H, sendo eles o Ho e Hn do IEM. O rendimento da reação não foi controlado.

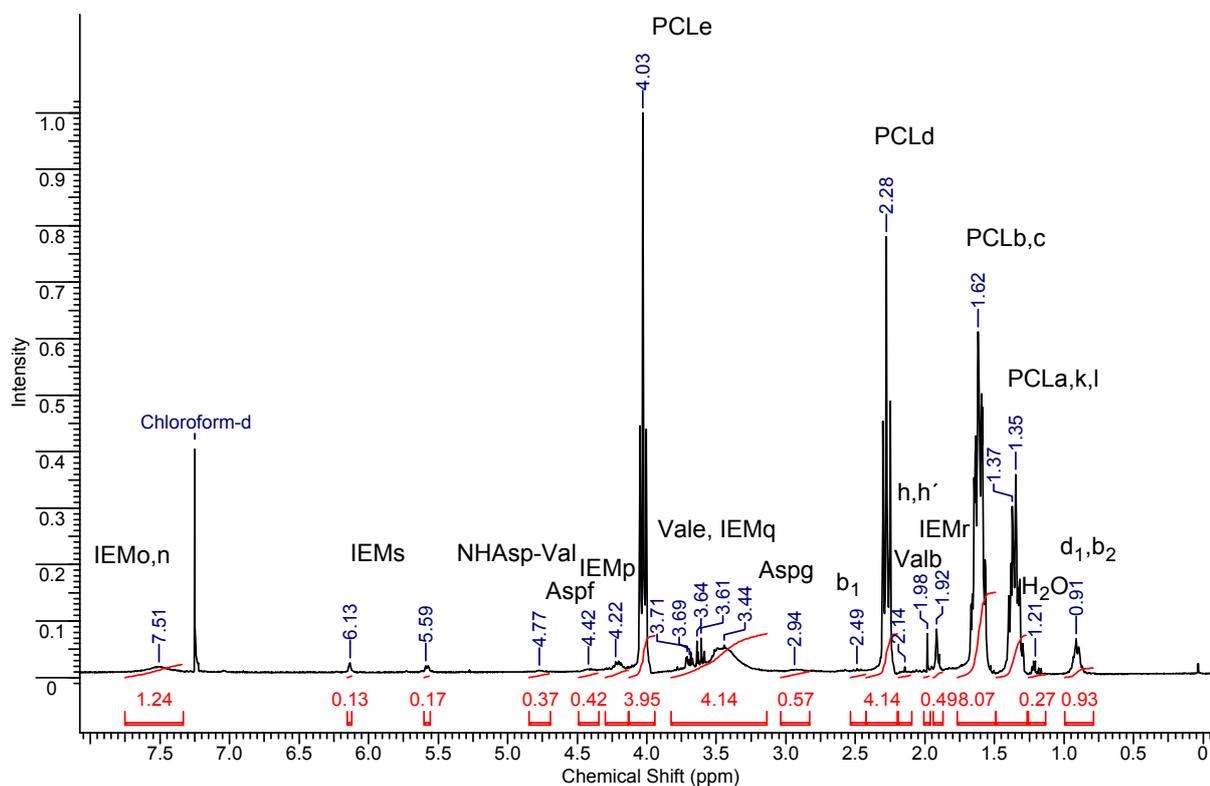


Figura 44. Espectro de RMN ¹H do produto Copolímero ARGETB-IEM-LD(OMe)V(OMe) (300 MHz, CDCl₃).

Apesar de alguns sinais terem saído com uma integral inferior ao número de hidrogênios e, outros hidrogênios da molécula, principalmente do LDV, não terem sido evidentes no espectro pode ser justificado pelo fato do copolímero ser uma molécula grande e a presença do DMAEMA pode ter encoberto a porção IEM-LD(OMe)V(OMe). Contudo, este resultado demonstra a presença de sinais oriundos de todos os componentes na molécula (PCL, DMAEMA, IEM, LDV), concluindo que a obtenção do produto foi possível.

5. DISCUSSÕES DO CAPÍTULO 1

Foi possível obter o macroiniciador Br-PCL-Br com conversão média de 80% após a otimização do procedimento de síntese para 3 dias a 40°C. Essa técnica baseou-se no trabalho de Sun (2005), que sintetizou o macroiniciador polioxidoetileno bromado (PEO-Br), para posteriormente copolimerizar com MMA, e necessitou de 18 horas a 25°C. Ainda, foi necessário o emprego de três tratamentos para sua purificação, sendo que a extração com ácido removeu as impurezas básicas da reação e a precipitação em éter permitiu remover o brometo de 2-isobutirila que não havia reagido com a PCL.

Considerando a técnica ATRP para a polimerização de PCL com monômeros DMAEMA contendo ou não MMA, podem-se discutir os resultados obtidos até o momento.

Ressalta-se que a maioria dos artigos pesquisados relataram a polimerização a 90°C ou superior (temperatura máxima relatada: 120°C), enquanto outros realizam a 60°C ou inferior, até mesmo a -15°C (MOINEAU, 1998; GROMADA, 2001; HADDLETON, 1998) e, devido a PCL apresentar um ponto de fusão de 60°C, em nossa pesquisa nenhuma síntese foi realizada abaixo desta temperatura, embora tenha-se empregado temperaturas superiores a LCST do DMAEMA (50°C em água).

Não foram testados diblocos, pois o trabalho se baseou na literatura que empregava como macroiniciador Br-PCL-Br e com este obteve-se o copolímero em bloco PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ denominado de MLT20 (45% (mol) de rendimento) que apresentou por infravermelho a presença de ligação éster e por RMN ¹H a presença de hidrogênios de PCL e dos monômeros MMA e DMAEMA em 3,8 e 2,8 ppm, respectivamente. Estes dados demonstraram a obtenção do produto desejado, o que é ressaltado e confirmado por GPC, uma vez que PCL possui 11 kDa e o copolímero obtido, 28 kDa com PDI = 1,71.

Até o momento na literatura existem apenas homopolímeros de PMMA, PDMAEMA ou blocos de PMMA-b-PDMAEMA sintetizados, sendo o uso com PCL citado na forma de blenda no preparo de nanopartículas e não na forma de copolímeros (PENOTT-CHANG, 2012; MORI, 2003). Em vista destes trabalhos

pretendeu-se o desenvolvimento de um material contendo PCL e DMAEMA (cuja presença de MMA fosse opcional).

Sendo assim, os ensaios foram realizados para a obtenção deste copolímero, entretanto, visando à utilização de menor quantidade de monômeros MMA, a razão 1:1 (massa, reação MLT20) foi modificada para 9:1 (massa) em termos de peso dos monômeros DMAEMA:MMA (reações denominadas MLT20/CF01-02).

As reações MLT20/CF01 e MLT20/CF02 produziram o produto de interesse e foram efetivas para a retirada do cobre por filtração em coluna de sílica gel 60, dando rendimentos de 51 a 64%, respectivamente. Foram encontrados artigos na literatura que sintetizaram blocos de DMAEMA e PCL com Mn que variam de 16 a 68 kDa, sendo assim os copolímeros MLT20/CF01 e MLT20/CF02 encontram-se com valores próximos de Mn (12,9 e 11,8 kDa, respectivamente) (JIANG, 2010; MONTALA-TIMOL, 2007a).

Logo, considerando a técnica ATRP convencional, o processo mais prático e rápido para a obtenção do copolímero em rendimento adequado foi a reação MLT20.

Empregou-se então a técnica de polimerização ATRP-ARGET visando à redução do uso de cobre no processo e a facilidade e/ou a eliminação da etapa de purificação do cobre para a obtenção do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂.

O copolímero ARGET-A foi possível obter com 70% de rendimento, sendo que o espectro de RMN ¹H apresenta a integração de sinais de hidrogênio de acordo com o trabalho de Miguel et al (2008), o qual sintetizou PDMAEMA-PCL-PDMAEMA, confirmando a obtenção do produto. Entretanto, foi necessário um procedimento de purificação para remoção de anisol e etilhexanoato de estanho empregados na síntese, tratamento este realizado com solubilização em metanol e precipitação em ciclohexano gelado. Contudo, foi observada a perda de funcionalização do copolímero (conforme anexos, integração de H_h,h' passa de 0,19 no macroiniciador a 0,08 no copolímero ARGET-A tratado com metanol). Ao substituir o tratamento com metanol por isopropanol, este permite que o grupamento de extremidade não seja afetado (anexos).

Baseado no trabalho de Baines (1996), que cita que o PMMA apresenta baixa toxicidade e, na preocupação com a futura aplicação biológica deste material na forma de um nanocarreador, procedeu-se a reação ARGET-B com a redução do emprego de MMA na síntese, obtendo um produto com 30% de rendimento (mol) com massa relativa de 20 kDa, calculada por RMN ¹H. A redução no rendimento

ocorreu, pois a amina do DMAEMA desativa o catalisador, uma vez que há muito pouco MMA no meio reacional para facilitar a polimerização (TSAREVSKY e MATYJASZEWSKI, 2007).

A técnica ATRP-ARGET se fez a mais prática de execução, menos custosa em relação ao uso de catalisador/reductor e eliminou a etapa de remoção do cobre ao final do processo de polimerização em comparação com a técnica ATRP convencional. Entretanto, exigiu a purificação do etilhexanoato de estanho e anisol e, ainda, apresentou maior rendimento (70% em ARGET-A), o qual diminui quando se reduz a quantidade de MMA empregada na síntese, embora mantenha um rendimento aceitável (30% em ARGET-B).

Huang e colaboradores (2013) citam que copolímeros de pluronic F127-P(DMAEMA) obtidos por ATRP que apresentaram mais que 100 unidades de DMAEMA repetidas no bloco acarretam em maior citotoxicidade. Com isso, os copolímeros produzidos por ATRP-ARGET provavelmente sejam menos citotóxicos por possuírem menos unidades de DMAEMA em sua constituição, quando se considera menores massas molares obtidos por GPC e, o ARGET-B pode ser considerado o mais promissor copolímero à aplicação biológica, por conter menor quantidade de MMA em sua composição.

A respeito dos resultados da funcionalização do copolímero com o tripeptídeo LDV, podemos ressaltar algumas observações:

- o preparo do produto L-Val(OMe) exigiu o uso de solventes secos e, seu preparo em temperatura ambiente pode variar de 5 horas (conforme MA, 2010) a 100 horas (conforme ZHOU, 2010). Para tornar a reação mais rápida pode-se empregar uso de temperatura, contanto que observando a não degradação o produto. Ainda, a forma cloridrato mantém o produto estável para ser armazenado a t.a. por meses.

- a metodologia empregada permitiu a obtenção do dipeptídeo com diferentes grupos de proteção amínicos (Boc e Fmoc), em conversões adequadas (40% e 60%, respectivamente). Foi necessário realizar um estudo do controle do tempo de adição de cada componente na reação, uma vez que é citado na literatura que ao realizar uma síntese peptídica com o uso de DCC como agente acoplador, este gera um composto derivado de N-acilurea, devido a rearranjos intramoleculares com perda do aminoácido ativado. Consequentemente, há a redução na formação de ponte

peptídica, bem como a interferência de solventes impuros que também podem reduzir a eficácia do aminoácido ativado (TOMETSKO, 1973).

Ressalta-se que o uso de DCC é apropriado, pois possui alta taxa reacional, menor custo e baixa racemização, embora pudesse ser substituído por outras carbodiimidias ou hidroxibenzotriazol/hexafluorofosfato de N,N,N',N'-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HOBT/HBTU) os quais são considerados os melhores ativadores após o DCC e são mais estáveis que o primeiro (VALEUR, 2009; HAN, 2004).

- as reações de desproteções testadas foram efetivas na remoção de grupamentos Boc e Fmoc. Na desproteção do grupamento Boc do dipeptídeo DV, no espectro de ressonância magnética de hidrogênio ocorre um sinal de terc-butanol uma vez que os solventes empregados na reação não estavam secos e havendo água no meio reacional esta reage com 2-metil-1-propeno gerando terc-butanol (que normalmente sai em 1,28 ppm, segundo Gottlieb, 1997).

- foi possível obter o éster metílico do tripeptídeo LDV (rendimento de 94,4%) e o produto IEM-LD(OMe)V(OMe) com 95% de rendimento (mol).

- E, também foi possível funcionalizar o copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ com IEM-LD(OMe)V(OMe).

6. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1

Por meio das diferentes metodologias realizadas foi possível obter o macroiniciador Br-PCL-Br e os copolímeros em bloco contendo PCL e DMAEMA, com e sem MMA, utilizando temperaturas mais brandas (60-95°C), variando o tempo de reação de 1 hora a 24 horas.

A técnica ATRP empregando apenas PCL e DMAEMA, demonstrou que o melhor rendimento obtido para o copolímero foi na reação DBS (30%) e, além de mais trabalhosa a síntese, observa-se a influência do emprego de MMA como agente auxiliar na propagação da polimerização.

E, o copolímero sintetizado a partir de PCL, MMA e DMAEMA permitiu a obtenção de rendimentos de 45% (copolímero MLT20) a 64% (MLT20/CF02). O produto MLT20/CF02, apesar de apresentar maior rendimento, também demandou maior tempo de reação e maior temperatura. Logo, foi escolhido o uso da MLT20 devido à praticidade e menor tempo de reação menor.

A técnica ATRP-ARGET, por sua vez, fornece o copolímero ARGET-A com 70% de rendimento e ARGET-B com 30% de rendimento e, exige menores concentrações de cobre assim como elimina necessidade de purificação do mesmo e, visto pela ótica do emprego de metal, tornando o produto mais seguro para aplicação biológica. Considerando a toxicidade do PMMA relatada na literatura (BAINES, 1996), ao reduzir-se a concentração de MMA no copolímero ARGET-B, trabalha-se com a hipótese da redução de citotoxicidade quando empregado em nanopartículas.

Desta forma, opta-se pelo método mais barato e ainda, rápido de preparo, ou seja, ATRP-ARGET-B. Este copolímero é preferido, pois é constituído por MMA e DMAEMA, monômeros que possuem caráter hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente e, conseqüentemente, formam um polímero com propriedades tensoativas, o qual é de interesse para aplicação em diferentes áreas. Além disto, torna-se uma técnica mais acessível economicamente, constituindo um material de interesse para a aplicação biológica.

A respeito da funcionalização do copolímero com o tripeptídeo LDV, por intermédio do IEM, foi possível obter a esterificação metílica da valina e o dipeptídeo com diferentes grupos de proteção amínico, em rendimentos de 40 e 60%, para Boc e Fmoc-dipeptídeo, respectivamente. Também foi possível realizar as reações de desproteção dos grupamentos amínicos (Boc e Fmoc) por diferentes métodos, permitindo obter o dipeptídeo com amina livre, para subsequente acoplamento com FmocLeuOH (formando o tripeptídeo, procedimento não realizado).

E, foi possível proteger as extremidades ácidas do tripeptídeo LDV, obtido comercialmente, com éster metílico e reagí-lo com IEM, obtendo IEM-LD(OMe)V(OMe), para finalmente, obter a funcionalização do copolímero, alcançando o produto PCL-P(MMA-DMAEMA-IEM-LDV)₂.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, S. K.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 14, p. 173-89. 1995.

ALVES, S.; CORREIA, J. D. G.; GANO, L.; ROLD, T. L.; PRASANPHANICH, A.; HAUBNER, R.; RUPPRICH, M.; ALBERTO, R.; DECRISTOFORO, C.; SANTOS, I.; SMITH, C. J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a novel $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -pyrazolyl conjugate of cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys). **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 530-7. 2007.

ALVES, M. A.. Uma abordagem geral sobre câncer e quimioterapia. In: Ciclo de seminários grupo PET, 2003. Disponível em: www.iq.unesp.br/pet/Cancer.pps. Acessado em: 01 de junho de 2010.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.. Câncer e Agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Revista Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-9. 2005.

ANJOS, A. R.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz extracelular e leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 3, p. 404-12. 2000.

AOUDJIT, F.; VUORI, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 20, p. 4995-5004. 2001.

ARAUJO, L.; SHEPPARD, M.; LÖBENBERG, R.; KREUTER, J. Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution in surfactant solutions and in oil vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, p.209-24. 1999.

ARSLAN, H.; HAZER, B. Ceric ion initiation of methyl methacrylate using polytetrahydrofuran diol and polycaprolactone diol. **European Polymer Journal**, v. 35, p. 1451-55. 1999.

AYRES, L.; VOS, M.R.J.; ADAMS, P.J.H.M.; SHKLYAREVSKIY, I.O.; HEST, J.C.M. VAN. Elastin-based side-chain polymers synthesized by ATRP. **Macromolecules**, v. 36, p. 5967-73. 2003.

AYRES, L.; KOCH, K.; ADAMS, H.H.M.; HEST, J.C.M. VAN. Stimulus responsive behavior of elastin-based side chain polymers. **Macromolecules**, v. 38, p. 1699-1704. 2005.

BAIER, G.; SIEBERT, J. M.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A. Surface click chemistry on polymeric nanocapsules for versatile functionalization. **Macromolecules**, v. 45, p. 3419-27. 2012.

BAINES, F. L.; ARMES, S. P.; BILLINGHAM, N. C.; TUZAR, Z. Micellization of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-*block*-methylmethacrylate) copolymers in aqueous solution. **Macromolecules**, v. 29, p. 8151-9. 1996.

BAIRAMOV, B.; TOPOROV, V.; BAYRAMOV, F.; LANZOV, V.; DUTTA, M.; STROSCIO, M. A.; IRMER, G. Inelastic laser light scattering spectroscopy of functionalization of semiconductor quantum dots with peptides and integrins of cancer cells for biophotonic applications. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 93, p. 1-7. 2007.

BAIRAMOV, B. H.; TOPOROV, V. V.; BAYRAMOV, F. B.; VASIDEV, M.; DUTTA, M.; STROSCIO, M. A.; IRMER, G. Semiconductors and Biomedical Structures for Nanometric Applications. **Proceedings**, v. 20, p. 594-97. 2008.

BALUNA, R.; COLEMAN, E.; JONES, C.; GHETIE, V.; VITETTA, E. S. The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. **Experimental Cell Research**, v. 258, p. 417-24. 2000.

BANERJEE, P.; IRVINE, D. J.; MAYES, A. M.; GRIFFITH, L. G. Polymer latexes for cell-resistant and cell-interactive surfaces. **Journal of Biomedical Matter Research**, v. 50, p. 331-39. 2000.

BAYRAMOGLU, G.; KAYAMAN-APOHAN, N.; AKÇAKAYA, H.; KAHRAMAN, M. V.; KURUCA, S. E.; GÜNGÖR, A. Preparation of collagen modified photopolymers: a new type of biodegradable gel for cell growth. **Journal of Material Sciences: Materials in Medicines**, v. 21, p. 761-75. 2010.

BECK, J. B.; KILLOPS, K. L.; KANG, T.; SIVANANDAN, K.; BAYLES, A.; MACKAY, M. E.; WOOLEY, K. L.; HAWKER, C. J. Facile preparation of nanoparticles by intramolecular crosslinking of isocyanate functionalized copolymers. **Macromolecules**, v. 42, n. 15, p. 5629-35.

BERRY, M. G.; GOODE, A. W.; PUDDEFOOT, J. R.; VINSON, G. P.; CARPENTER, R. Integrin β_1 upregulation in MCF-7 breast cancer cells by angiotensin II. **European Journal of Cirurgical Oncology**, v. 26, p. 25-29. 2000.

BIBBY, D. C.; TALMADGE, J. E.; DALAL, M. K.; KURZ, S. G.; CHYTIL, K. M.; BARRY, S. E.; SHAND, D. G.; STEIERT, M. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice. **Intenational Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 281-90. 2005.

BORMAN, C. D.; JACKSON, A. T.; BUNN, A.; CUTTER, A. L.; IRVINE, D. J. Evidence for the low thermal stability of poly(methyl methacrylate) polymer produced by atom transfer radical polymerization. **Polymer**, v. 41, p.6015-20. 2000.

BOUGARD, F.; JEUSETTE, M.; MESPOUILLE, L.; DUBOIS, P.; LAZZARONI, R. Synthesis and supramolecular organization of amphiphilic diblock copolymers combining poly(*N,N*-dimethylamino-2-ethyl-methacrylate) and poly(ϵ -caprolactone). **Langmuir**, v. 23, p. 2339-45. 2005.

BRASIL, 2002. Instituto Nacional do Câncer. *Fisiopatologia do Câncer – A situação do câncer no Brasil*. Capítulo 2. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2010.

BRASIL, 2009. Instituto Nacional do Câncer. ***Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil***. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>. Acesso em: 25 de janeiro de 2010.

BRASIL, 2012. Instituto Nacional do Câncer. ***Estimativa 1996-2012***. Disponível em: <www2.inca.gov.br/wps/connect/inca/portal/home>. Acesso em 10/05/2012.

BULMUS, V.; PATIR, S.; TUNCEL, S. A.; PISKIN, E. Stimuli-responsive properties of conjugates of N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid oligomers with alanine, glycine and serine mono-, di- and tri-peptides. ***Journal of Controlled Release***, v. 76, p. 265-74. 2001.

CAMPOS, A. de; FRANCHETTI, S. M. M.; AGNELLI, J. A. M. Biotransformation of poly(ϵ -caprolactone) and poly(vinyl chloride) blend. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 34, n. 1, p. 111-3. 2003.

CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. ***Journal of Organic Chemistry***, v. 37, n. 22, p. 3404-09. 1972.

CHAN, N.; CUNNINGHAM, M. F.; HUTCHINSON, R. A. Reducing ATRP catalyst concentration in batch, semibatch and continuous reactors. ***Macromolecular Reaction Engineering***, v. 4, p. 369-80, 2010.

CHEN, X.; PLASENCIA, C.; HOU, Y.; NEAMATI, N. Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin targeted drug delivery. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 48, p. 1098-1106. 2005.

CHEN, Z.; DENG, J.; ZHAO, Y.; TAO, T. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats. ***International Journal of Nanomedicine***, v. 7, p. 3803-11. 2012.

CUCCOVIA, I. M.; MARTINS, M. T.; SARAIVA, G. K. V. Estudo do efeito do copolímero PMMA-b-PDMAEMA em modelos de membrana com diferentes cargas. In: 21^o Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – USP, de 21 a 23 de outubro de 2013a.

CUCCOVIA, I. M.; AIDAR, I. N.; SARAIVA, G. K. V.; FLORENZANO, F. H.. Caracterização do copolímero PMMA(1)-b-PDMAEMA(1,3) e estudo do seu efeito sobre a permeabilidade de vesículas de fosfolipídeos. In: 21^o Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – USP, de 21 a 23 de outubro de 2013b.

DARCOS, V.; TABCHI, H. A.; COUDANI, J. Synthesis of PCL-graft-PS by combination of ROP, ATRP and click chemistry. **European Polymer Journal**, v. 47; p. 187-95. 2011.

DANHIER, F.; VROMAN, B.; LECOUTURIER, N.; CROKART, N.; POURCELLE, V.; FREICHELS, H.; JÉRÔME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; FERON, O.; PRÉAT, V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel **Journal of Controlled Release**, v. 140, p. 166-73. 2009.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Balancing immune response: crosstalk between adaptative and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 212, p. 1-10. 2007.

DONG, H.; MATYJASZEWSKI, K. ARGET ATRP of 2-(Dimethylamino) ethyl methacrylate as an intrinsic reducing agent. **Macromolecules**, v. 41, p. 6868-70. 2008.

DONG, A.; ZHAI, Y.; XIAO, L.; QI, H.; TIAN, Q.; DENG, L.; GUO, R. Thermosensitive behavior of poly(ethylene glycol)/poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate) double hydrophilic block copolymers. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 48, p. 503-8. 2010.

DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and prostate cancer: what is the clinical benefit? **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 18, p. 2691-3. 2006.

FELDING-HABERMANN, B.; LERNER, R. A.; LILLO, A.; ZHUANG, S.; WEBER, M. R.; ARRUES, S.; GAO, C.; MAO, S.; SAVEN, A.; JANDA, K. D. Combinatorial antibody libraries from cancer patients yield ligand-mimetic Arg-Gly-Asp-containing immunoglobulins that inhibit breast cancer metastasis. **PNAS**, v. 101, n. 49, p. 17210-5. 2004.

FERREIRA, P.; COELHO, J.F.J.; GIL, M.H. Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 172-81. 2008.

FIEVEZ, V.; PLAPIED, L.; RIEUX, A. des; POURCELLE, V.; FREICHELS, H.; WASCOTTE, V.; VANDERHAEGHEN, M.-L.; JÉRÔME, C.; VANDERPLASSCHEN, A.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; SCHNEIDER, Y.-J.; PRÉAT, V. Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 16-24. 2009.

FISCHER, P.M.; SOLBAKKEN, M.; UNDEHEIM, K. Solution synthesis of a dimeric pentapeptide: diketopiperazine cyclisation of Glu-Asp dipeptide esters and Asp racemisation during segment condensation. **Tetrahedron**, v. 50, n. 7, p. 2277-88. 1994.

FIELDS, G.B. Methods for removing the Fmoc Group. **Methods in Molecular Biology: Peptide Synthesis Protocols**, v. 35, p. 17-27. 1994.

FORNARO, M.; MANES, T.; LANGUINO, L. R. Integrins and prostate cancer metastasis. *Cancer and Metastasis Review*, v. 20, p. 321-31. 2001.

GAO, H.; MATYJASZEWSKI, K. Synthesis of star polymers by a combination of ATRP and the "click" coupling method. *Macromolecules*, v. 39, p. 4960-5. 2006.

GARG, A.; TISDALE, A. W.; HAIDARI, E.; KOKKOLI, E. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 366, p. 201-10. 2009.

GLINSKY, G. V. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Review*, v. 3, p. 79-93. 2007.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry*, v. 62, p. 7512-7515. 1997.

GOUTAYER, M.; DUFORT, S.; JOSSERAND, V.; ROYÈRE, A.; HEINRICH, E.; VINET, F.; BIBETTE, J.; COLL, J.-L.; TEXIER, I. Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 75, p. 137-47. 2010.

GUI, G. P. H.; WELLS, C. A.; BROWNE, P. D.; YEOMANS, P.; JORDAN, S.; PUDDEFOOT, J. R.; VINSON, G. P.; CARPENTER, R. Integrin expression in primary breast cancer and its relation to axillary nodal status. *Surgery*, v. 117, p. 102-8. 1995.

GUO, S.; QIAO, Y.; WANG, W.; HE, H.; DENG, L.; XING, J.; XU, J.; LIANG, X.-J.; DONG, A. Poly(ϵ -caprolactone)-graft-poly(2-(N,N'-dimethylamino) ethyl methacrylate) nanoparticles: pH dependent thermo-sensitive multifactorial carriers for gene and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry*, v. 20, p. 6935-41, 2010.

GROMADA, J.; SPANSWICK, J.; MATYJASZEWSKI, K. Synthesis and ATRP activity of new TREN-based ligands. *Macromolecules Chemistry Physics*, v. 205, n.5, p. 551-66. 2004.

HADDLETON, D. M.; KUKULJ, D.; DUNCALF, D. J.; HEMING, A. M.; SHOOTER, A. J. Low-temperature living "radical" polymerization (atom transfer polymerization) of methyl methacrylate mediated by copper (I) N-alkyl-2-pyridylmethanimine complexes. *Macromolecules*, v. 31, p. 5201-05, 1998.

HAN, S.-Y.; KIM, Y.-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*, v. 60, p. 2447-67. 2004.

HEISE, A.; TROLLSAS, M.; MAGBITANG, T.; HEDRICK, J. L.; FRANK, C. W.; MILLER, R. D. Star polymers with alternating arms from miktifunctional μ -initiators using consecutive atom transfer radical polymerization and ring-opening polymerization. *Macromolecules*, v. 34, p. 2798-2804. 2001.

HENSARLING, R. M.; RAHANE, S. B.; LEBLANC, A. P.; SPARKS, B. J.; WHITE, E.

- M.; LOCKLIN, J.; PATTON, D. L. Thiol-isocyanate “click” reactions: rapid development of functional polymeric surfaces. *Polymer Chemistry*, v.2, n. 1, p. 1-252. 2010/2011.
- HOFFMANN, S.; HE, S.; JIN, M. EHREN, M.; WIEDERMANN, P.; RYAN, S. J.; HINTON, D.R.. Selective cyclic integrin antagonist blocks integrin receptors $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion. *BMC Ophthalmology*, v. 5, n. 16, p. 1-8. 2005.
- HONG, S. C.; NEUGEBAUER, D; INOUE, Y.; LUTZ, J-F.; MATYJASZEWSKI, K. Preparation of segmented copolymers in the presence of na immobilized/soluble hybrid ATRP catalyst system. *Macromolecules*, v. 36, n. 1, p. 27-35, 2003.
- HUANG, S.J.; WANG, T.P.; LUE, S.I.; WANG, L.F. Pentablock copolymers of pluronic F127 and modified poly(2-dimethyl amino)ethyl methacrylate for internalization mechanism and gene transfection studies. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 2011-27. 2013.
- HUHTALA, P.; HUMPHRIES, M. J.; MCCARTHY, J. B.; TREMBLE, P. M.; WERB, Z.; DAMSKY, C. H. Cooperative signaling by $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, v. 129, n. 3, p. 867-79. 1995.
- HUMPHRIES, M. J.. The LDV peptide motif: its role in integrin-ligand binding. *Top Molecular Medicine*, v. 1, p. 27-35. 1995.
- JAIN, A. K. et al. Augmented anticancer efficacy of doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles after oral administration in a breast cancer induced animal model, *Molecular Pharmaceutics*, v. 8, p. 1140-51. 2011.
- JIA, Y.; ZENG, Z.-Z.; MARKWART, S. M.; ROCKWOOD, K. F.; IGNATOSKI, K. M. W.; ETHIER, S. P.; LIVANT, D. L. Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells. *Cancer Research*, v. 64, p. 8674-81. 2004.
- JIANG, X.; VAMVAKAKI, M.; NARAIN, R. Copper-catalyzed bimolecular coupling of α - ω -dibromide of functionalized poly-(γ -caprolactone). *Macromolecules*, v. 43, p. 3228-32, 2010.
- JOHANSSON, S.; SVINENG, G.; WENNERBERG, K.; ARMULIK, A.; LOHIKANGAS, L. Fibronectin-integrin interactions. *Frontiers in Bioscience*, v. 2, p. d126-46. 1997.
- JOHNSON, R.-P.; JEONG, Y.-I.; CHOI, E.; CHUNG, C.-W.; KANG, D.H.; OH, S.-O.; SUH, H.; KIM, I. Biocompatible poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-b-poly(L-hystidine). Hybrid materials for pH-sensitive intracelular anticancer drug delivery. *Advanced Functional Materials*, v. 22, p. 1058-68. 2012.
- JONSSON, M.; NYSTRÖM, D.; NORDIN, O.; MALMSTRÖM, E. Surface modification of thermally expandable microspheres by grafting poly(glycidyl methacrylate) using ARGET ATRP. *European Polymer Journal*, v. 45, p. 2374-82. 2009.

KIM, S.; BELL, K.; MOUSA, S. A.; VARNER, J. A. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5\beta 1$ with the central-cell binding domain of fibronectin. ***American Journal of Pathology***, v. 156, n. 4, p. 1345-62. 2000.

KOTAMRAJ, P. R.; LI, X.; JASTI, B.; RUSSU, W. A. Cell recognition enhanced enzyme hydrolysis of a model peptide-drug conjugate. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***, v. 19, p. 5877-79. 2009.

KULBE, H.; LEVINSON, N. R.; BALKWILL, F.; WILSON, J. L. The chemokine network in cancer – much more than directing cell movement. ***International Journal of Delivery Biology***, v. 48, p. 489-496. 2004.

KUROHANI, K.; NAMBA, Y.; OKU, N. Liposomes modified with a synthetic Arg-Gly-Asp mimetic inhibit lung metastasis of B-16BL6 melanoma cells. ***Life Sciences***, v. 68, p. 273-81. 2000.

KWAK, Y.; NICOLAÏ, R.; MATYJASZEWSKI, K. Concurrent ATRP/RAFT of Styrene and Methyl methacrylate with dithioesters catalysed by copper (I) complexes. ***Macromolecules***, v. 41, p. 6602-4. 2008.

KWAK, Y.; MATYJASZEWSKI, K. ARGET ATRP of methyl methacrylate in the presence of nitrogen-based ligands as reducing agents. ***Polymer International***, v. 58, p. 242-7. 2009.

KWAK, Y.; MAGENAU, A. J. D.; MATYJASZEWSKI, K. ARGET ATRP of Methyl acrylate with inexpensive ligands and ppm concentrations of catalyst. ***Macromolecules***, v. 44, p. 811-9. 2011.

MA, C.; Cao, R.; Shi, B.; Li, S.; Chen, Z.; Yi, W.; Peng, W.; Ren, Z.; Song, H. Synthesis and cytotoxic evaluation of N²-benzylated quarternary β -carboline amino acid ester conjugates. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 45, p.1515-23. 2010.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M.. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. ***Química Nova***, v. 27, n. 5, p. 781-9, 2004.

MÉNDEZ, J. A.; ABRAHAM, G. A.; FERNÁNDEZ, M. M.; VÁZQUEZ, B.; ROMÁN, J. S. Self-curing acrylic formulations containing PMMA/PCL composites: Properties and antibiotic release behavior. ***Journal of Biomedical Materials Research***, v. 61, p. 66-74. 2002.

MIGUEL, V. S.; LIMER, A. J.; HADDLETON, D. M.; CATALINA, F.; PEINADO, C. Biodegradable and thermoresponsive micelles of triblock copolymers based on 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate and ϵ -caprolactone for controlled drug delivery. ***European Polymer Journal***, v. 44, p. 3853-63. 2008.

MIN, D.-H; MRKSICH, M. Peptide arrays: towards routine implementation. ***Current Opinion in Chemical Biology***, v. 8, p. 554-8, 2004.

MIN, K.; GAO, H.; MATYJASZEWSKI, K. Use of ascorbic acid as reducing agent for synthesis of well-defined polymers by ARGET ATRP. *Macromolecules*, v. 40, p. 1789-91. 2007.

MOINEAU, G.; GRANEL, C.; DUBOIS, Ph.; JÉRÔME, R.; TEYSSIE, Ph. Controlled radical polymerization of methyl methacrylate initiated by an alkyl halide in the presence of the Wilkinson catalyst. *Macromolecules*, v. 31, p. 542-4, 1998.

MONTALA-TIMOL, S.; JHURRY, D. (a) Synthesis of PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers. *European Polymer Journal*, v. 43, p. 3042-9, 2007.

MONTALA-TIMOL, S.; JHURRY, D. (b) Synthesis of graft and block copolymers from 2-dimethylaminoethyl methacrylate and caprolactone. *Polymer International*, v. 56, p. 1053-62, 2007.

MORI, H.; MULLER, A. H. E. New polymeric architectures with meth(acrylic) acid segments. *Progress in Polymer Science*, v. 28, p. 1403-39. 2003.

MORELL, M; PUIGGALÍ, J. Hybrid block copolymers constituted by peptides and synthetic polymers: an overview of synthetic approaches, supramolecular behavior and potencial applications. *Polymers*, v. 5, p. 188-224. 2013.

NAGY, A.; SZOKE, B.; SCHALLY, A.V.; Selective coupling of methotrexate to peptide hormone carriers through a γ -carboxiamide linkage of its glutamic acid moiety: benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate activation in salt coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, p. 6373-6. 1993.

NASCIMENTO, M. C. M. O.; MARTINS, A. S. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivo de Ciências da Saúde*, v. 12, n. 2, p. 111-5. 2005.

NEVILLE-WEBBE, H.L.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; EVANS, C. A.; COLEMAN, R. E.; HOLEN, I. Sequence- and schedule-dependent enhancement of zoledronic acid induced apoptosis by doxorubicin in breast and prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, v. 113, p. 364-71. 2005.

NICOLAS, J.; MIGUEL, V. S.; MANTOVANI, G.; HADDLETON, D. M. Fluorescently tagged polymer bioconjugates from proteins derived macroinitiators. *Supplementary Information from Chemical Communications*, p. 4697-9, 2006.

NICOLAS, J.; MANTOVANI, G.; HADDLETON, D. M. Living radical polymerization as a tool for the synthesis of polymer-protein/peptide bioconjugates. *Macromolecular Rapid Communication*, v.28, p. 1083-1111. 2007.

NICOLAÿ, R.; KWAK, Y.; MATYJASZEWSKI, K. A Green route to well-defined high-molecular-weight (co)-polymers using ARGET ATRP with alkyl pseudohalides and copper catalysis. *Angewandte Chemie*, v. 122, p. 551-4. 2010.

NOORANI, H. Z.; MCGAHAN, L. 1999. Predictive genetic testing for breast and prostate cancer. Canadian Agency for Drugs and Technology in Health. Disponível em: <<http://www.cadth.ca/index.php/en/hta/reportspublications/search/publication/18>>. Acesso em: 10/01/2011.

OH, J. H.; MIN, K.; MATYJASZEWSKI, K. Preparation of poly(olygo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate) by homogeneous aqueous AGET ATRP. **Macromolecules**, v. 39, p. 3161-7, 2006.

OLIVEIRA, C. P.; VENTURINI, C. G.; DONIDA, B.; POLETTO, F. S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations *Soft Matter*, v. 9, p. 1141-1150. 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry. 2nd edition. Washington, USA: Saunders, College Publishing, 1996.

PATEL, P. R.; KISER, R. C.; LU, Y. Y.; FONG, E.; HO, W. C.; TIRRELL, D. A.; GRUBBS, R. H. Synthesis and cell adhesive properties of linear and cyclic RGD functionalized polynorbornene thin films. **Biomacromolecules**, v.13, n. 8, p. 2546-2553. 2012. DOI: 10.1021/bm300795y.

PATEL, R. P.; PRICE, S. Synthesis of benzyl esters of α -amino-acids. **Notes from Monsanto Research Corporation**, Massachusetts, v. 30, p. 3575-6. 1965.

PATTEN, T. E.; MATYJASZEWSKI, K. Copper(I)-catalyzed atom transfer radical polymerization. **Acta Chemical Research**, v. 32, p. 895-903, 1999.

PENG, L.; LIU, R.; MARIK, J.; WANG, X.; TAKADA, Y.; LAM, K. S. Combinatorial chemistry identifies high-affinity peptidomimetics against $\alpha_4\beta_1$ for *in vivo* tumor imaging. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 7, p.381-9. 2006.

PENOTT-CHANG, E. Amphiphilic diblock copolymers: study of interpolyelectrolyte complexation in organic media and nanoencapsulation of melatonin. 2011. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de química, Universität Bayreuth, Valencia, Venezuela, 2011.

PENOTT-CHANG, E.; ANDREAS, W.; PIERRE, M.; JÄGER, A.; JÄGER, E.; MÜLLER, A. H. E.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Amphiphilic diblock copolymer and polycaprolactone blends to produce new vesicular nanocarriers. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 272-9. 2012.

PORTELA, A. 2014. Linfócitos T, TCR, receptores e maturação. Disponível em: <http://image.slidesharecdn.com/aulalinfocitost-140423131028-phpapp02/95/linfcitos-t-tcr-receptores-e-maturao-15-638.jpg?cb=1398277699>. Acesso em: 03 fev. 2015.

RIMESSI, P.; SABATELLI, P.; FABRIS, M.; BRAGHETTA, P.; BASSI, E.; SPITALI, P.; VATTEMI, G.; TOMELLERI, G.; MARI, L.; PERRONI, D.; MEDICI, A.; NERI, M.;

BOVOLENTA, M.; MARTONI, E.; MARALDI, N. M.; GUALANDI, F.; MERLINI, L.; BALLESTRI, M.; TONDELLI, L.; SPARNACCI, K.; BONALDO, P.; CAPUTO, A.; LAUS, M.; FERLINI, A. Cationic PMMA nanoparticles bind and delivery antisense oligonucleotides allowing restoration of dystrophin expression in the *mdx* mouse. **Molecular therapy**, v. 17, n.5, p. 820-7. 2009.

RYPPA, C.; MANN-STEINBERG, H.; FICHTNER, I.; WEBER, H.; SATCHI-FAINARO, R.; BINIOSSEK, M. L.; KRATZ, F. In vitro and in vivo evaluation of doxorubicin conjugates with the divalent peptide E-[c(RGDfK)₂] that targets integrin $\alpha_v\beta_3$. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, p. 1414-22. 2008.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu. Review of Cell Delivery Biology**, v. 12, p. 697-715. 1996.

SAKAKIBARA, S. Chemical Synthesis of proetins in solution. **Biopolymers (Peptide Sciences)**, v. 51, p. 279-96, 1999.

SCHAFFNER, P.; DARD, M. M. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 119-32. 2003.

SCHLAAD, H.; ANTONIETTI, M. Block copolymers with amino acid sequences: molecular chimeras of polypeptides and synthetic polymers. **The European Physical Journal E**, v. 10, p. 17-23. 2003.

SEFTOR, R. E. B.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. C. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 18, p. 359-75. 1999.

SHAKAYA, A.K.; SAMI, H.; SRIVASTANA, A.; KUMAR, A. Stability of responsive polymer-protein bioconjugates. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 459-86. 2010.

SHEN, Y.; TANG, H.; DING, S. Catalyst separation in atom transfer radical polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 1053-78, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7^a Ed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2006.

SPRINGER, M. P.; CURRAN, C. Infrared spectra of complexes of metal halides with esters of amino acids. **Inorganic Chemistry**, v. 2, n. 6, p.1270-75.1963.

STEVENS, J. S.; LUCA, A. C. de, DOWNES, S.; TERENCEHI, G.; SCHROEDER, L. M. Immobilization of cell-binding peptides on poly- ϵ -caprolactone (PCL) films: A comparative XPS study of two chemical surface functionalization methods. **Surface and Interface Analysis**, v. 46, p. 673-78. 2014.

SUMERLIN, B. S.; TSAREVSKY, N. V.; LOUCHE, G.; LEE, R. Y.; MATYJASZEWSKI, K. High efficient "click" functionalization of poly(3-azidopropyl methacrylate) prepared by ATRP. **Macromolecules**, v. 38, p. 7540-5. 2005.

SUN, X.; ZHANG, H.; HUANG, X.; WANG, X.; ZHOU, Q.-F. Synthesis of poly(ethylene oxide)-*block*-poly(methyl methacrylate)-*block*-polystyrene triblock copolymers by two-step atom transfer radical polymerization. *Polymer*, v. 46, p. 5251-7. 2005.

SUN, X.; LIU, J.; LEE, M. L. Surface modification of glycidyl-containing poly(methyl methacrylate) microchips using surface-initiated atom-transfer radical polymerization. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 856-63, 2008.

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins – Protein family review. *Genome Biology*, v. 8, n. 5, article 215, p. 1-9. 2007.

TANG, H.; SHEN, Y.; LI, B.-G.; RADOSZ, M. Tertiary amine – enhanced activity of ATRP catalysts CuBr/TPMA and CuBr/Me6TREN. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 29, p. 1834-8, 2008.

TSAREVSKI, N. V.; MATYJASZEWSKI, K. “Green” Atom transfer radical polymerization: from process design to preparation of well-defined environmentally friendly polymeric materials. *Chemical Review*, v. 107, p. 2270-99, 2007.

TEO, L.-S.; CHEN, C.-Y.; KUO, J.-F. Fourier transform infrared spectroscopy study on effects of temperature on hydrogen bonding in amine-containing polyurethanes and poly(urethane-urea)s. *Macromolecules*, v. 30, p. 1793-99. 1999.

TSELEPIS, V.H.; GREEN, L.J.; HUMPHRIES, M. J. An RGD to LDV motif conversion within the disintegrin Kristin generates an integrin antagonist that retains potency but exhibits altered receptor specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 34, p. 21341-8. 1997.

TOMETSKO, A. M. Determining the availability of activated amino acids for solid phase peptide synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 50, n. 3, p. 886-91. 1973.

TOSI, G.; CONSTANTINO, L.; RIVASI, F.; RUOZI, B.; LEO, E.; VERGONI, A. V.; TACCHI, R.; BERTOLINI, A.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F. Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with loperamide and rhodamine-123. *Journal of Controlled Release*, v. 122, p. 1-9. 2007.

UGAROVA, T. P.; LJUBIMOV, A. V.; DENG, L.; PLOW, E. F. Proteolysis regulates exposure of the IIICS-1 adhesive sequence in plasma fibronectin. *Biochemistry*, v. 35, p. 10913-21. 1996.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, v. 38, p. 606-31. 2009.

VERDUN, C. et al. Tissue distribution of doxorubicin association with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 26, p. 13-18. 1990.

VON HOFF, D. D.; LAYARD, M. W.; BASA, P.; DAVIS, JR. H. L.; VON HOFF, A. L.; ROZENCWEIG, M.; MUGGIA, F. M. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annual International Medicine**, v. 91, p. 710-17. 1979.

WAITKUS-EDWARDS, K. R.; MARTINEZ-LEMUS, L. A.; WU, X.; TRZECIAKOWSKI, J. P.; DAVIS, M. J., DAVIS, G. E.; MEINIGER, G. A. $\alpha_4\beta_1$ integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. **Circulation research**, v. 90, p. 437-80. 2002.

WERKMEISTER, J.A.; ADHIKARI, R.; WHITE, J. F.; TEBB, T.A.; LE, T.P.T.; TAING, H.C.; MAYADUNNE, R.; GUNATILLAKE, P.A.; DANON, S.J.; RAMSHAW, J.A.M. Biodegradable and injectable cure-on-demand polyurethane scaffolds for regeneration of articular cartilage. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3471-81. 2010.

XIN, D.; WANG, Y.; XIANG, J. The use of amino acid linkers in the conjugation of paclitaxel with hyaluronic acid as drug delivery system: synthesis, self-assembled property, drug release, and in vitro efficiency. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 2, p. 380-9. 2010.

XIONG, X. B.; HUANG, Y.; LU, W.-L.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; NAGAI, T.; ZHANG, Q.. Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with synthetic RGD mimetic. **Journal of Controlled Release**, v. 107, p. 262-75. 2005.

XU, P.; KIRK, E. A. V.; MURDOCK, W. J.; ZHAN, Y.; ISAAK, D. D.; RADOSZ, M.; SHEN, Y. Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 829-35. 2006.

ZENG, F.; SHEN, Y.; ZHU, S.; PELTON, R. Atom transfer radical polymerization of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in aqueous media. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, p. 3821-7. 2000.

ZHANG, Z.; VUORI, K.; REED, J. C.; RUOSLAHTI, E. The $\alpha_5\beta_1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **Cell Biology**, v. 92, p. 6161-65, 1995.

ZHENG, G.; STÖVER, H. D. H. Grafting of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone-block-(dimethylamino)ethyl methacrylate) from polymer microspheres by ring-opening polymerization and ATRP. **Macromolecules**, v. 36, p. 7439-45. 2003.

ZHONG, S.; BHATTACHARYA, S.; CHAN, W.; JASTI, B.; LI, X. 2009. Leucine-Aspartic Acid-Valine sequence as targeting ligand and drug carrier of doxorubicin delivery to melanoma cells: In vitro cellular uptake and cytotoxicity studies. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 12, p. 2578-87, 2009.

ZHOU, Y.; Zhao, M.; Wu, Y.; Li, C.; Wu, J.; Zheng, M.; Peng, L.; Peng, S. A class of novel Schiff's bases: synthesis, therapeutic action for chronic pain, anti-inflammation and 3D-QSAR analysis. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2165-72. 2010.

ZHU, C.; JUNG, S.; LUO, S.; MENG, F.; ZHU, X.; PARK, T. G.; ZHONG, Z. Co-delivery of siRN and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers. *Biomaterials*, v. 31, p. 2408-16. 2010.

ZUPANCICH, J. A.; BATES, F. S.; HILLMYER, M. A. Synthesis and self-assembly of RGD-functionalized PEO-OS amphiphiles. *Biomacromolecules*, v. 10, p. 1554-63. 2009.

CAPÍTULO 2: Nanopartículas de PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ pH-responsivas contendo doxorrubicina: avaliação biológica *in vitro*

INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO 2

As terapias empregadas para controle e tratamento de câncer são, principalmente, radio e quimioterapia e cirurgia para remoção do tumor sólido. Entretanto, esses tratamentos são muito danosos ao tecido circundante afetando não somente as células cancerígenas, como também células saudáveis e ainda, podem ocorrer reincidivas do retorno do câncer ocasionando em mortalidade (DENARDO, 2007; DUBOIS, 2006).

Atualmente, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos ganhou grande destaque devido à possibilidade de aumentar a biodisponibilidade (veicular menor concentração de ativo ao tecido alvo), sustentar a liberação e reduzir toxicidade às células vizinhas, principalmente, para o tratamento de cânceres (OLIVEIRA, 2013; FIEL, 2013; REIS, 2006b; GENNARO, 2005).

Neste contexto, nanocarreadores estão sendo estudados, incluindo lipossomas, micelas poliméricas e nanopartículas, entre outros dispositivos. As nanopartículas poliméricas ganham atenção devido a sua biodegradabilidade, por apresentarem capacidade de modificação química de sua superfície, permitindo maior tempo de circulação no corpo (FIEL, 2013; SHENOY, 2006). As modificações químicas na superfície das nanopartículas visam à proteção enzimática durante a circulação até o alcance do câncer para ocorrer a ação terapêutica e/ou a interação de moléculas capazes de conectarem com receptores específicos das superfícies das células (BIERLY, 2011; CHO, 2008; SERPE, 2006).

As nanopartículas com superfície convencional (não-modificada) são capturadas pelo sistema retículo endotelial, conhecido por RES, que inclui o fígado e baço. A captura depende do tamanho e das características de superfície da partícula. Portanto, o tamanho das nanopartículas deve ser grande o suficiente para prevenir a fuga dos capilares sanguíneos, mas pequeno o suficiente para permitir o escape da captura por macrófagos conectados ao RES (CHO, 2008).

Considerando o tamanho da sinusóide do baço e das fenestras das células de Kuffer do fígado (150 a 200 nm) e as rupturas entre células endoteliais da vasculatura do tumor (200 a 780 nm), o tamanho das nanopartículas deve ser maior que 100 nm e, preferencialmente, menor que 200 nm para alcançar o tumor passando por essas estruturas. Além disso, eles não atravessariam um tecido normal, onde as fenestras variam de 5 a 10 nm. (CHO, 2008; SINECK, 2004).

Quanto às características de superfície, estas devem impedir à captura pelo RES, ou seja, driblar o sistema imune ao reconhecimento do nanocarreador. O uso de copolímeros amfifílicos aplicados a nanopartículas tem sido muito útil, pois permite estabilizar interfaces em meio aquoso e o copolímero que apresente uma composição química definida com micelinização e formação de núcleo hidrofóbico serve como um reservatório de fármacos, dependendo da funcionalidade disponível no núcleo e de sua solubilidade. Já a porção hidrofílica oferece a camuflagem ao reconhecimento do sistema imune e posterga sua eliminação da corrente sanguínea (VALENTE, 2013).

Considerando que a permeabilidade capilar encontra-se aumentada quando a integridade endotelial foi prejudicada na ocorrência de inflamação e cânceres, é provável a ocorrência do aumento de extravasamentos moleculares, como de nanopartículas, dos vasos sanguíneos para os tumores e a retenção destas no tecido tumoral é chamada de efeito de aumento de permeabilidade e retenção ou efeito EPR (GENNARO, 2005).

O efeito EPR é considerado um padrão ouro para o planejamento de um nanocarreador e, acontece em praticamente todos os cânceres humanos de rápido crescimento, exceto nos hipovasculares como o câncer prostático ou pancreático (VERDUN, 1990). Sua ocorrência se dá concomitante à vasculatura defeituosa, lento retorno venoso, drenagem linfática prejudicada e aumento de mediadores químicos no local (VERDUN, 1990; ACHARYA, 2011). O emprego de nanopartículas nesses casos é promissor por simples efeito de exclusão de tamanho e, por efeito de permeabilidade/retenção (EPR).

É importante ressaltar que no tecido tumoral, as condições do ambiente encontram-se modificadas, como: a mudança do pH para ácido (pH~5,0) e a presença de maior irrigação sanguínea (neovascularização), entre outros fatores.

Baseado nas condições dos tumores e na alta incidência e recorrência (40%) dos cânceres de mama humanos, a doxorubicina foi escolhida como fármaco

padrão. Esta antraciclina, também conhecida por adriamicina, age em diferentes tipos de cânceres, inibindo a DNA-girase e modificando a transcrição de genes e em sua forma livre apresenta-se como um cardiotoxíco, depressor da medula óssea e causador de desordens gastrointestinais. Uma vez encapsulado na nanopartícula, estes efeitos podem ser reduzidos ou até mesmo eliminados já que não atingirá tecidos normais (VERDUN, 1990; GUO, 2013).

A linhagem celular MCF-7 (de câncer de mama humano) foi definida para experimentação uma vez que expressa receptores celulares para diferentes hormônios e peptídeos que atuam regulando a proliferação, diferenciação e migração celulares (MIGUEL, 2008; CSABA, 2005). As células MCF-7 foram isoladas em 1970 a partir de tecido tumoral mamário de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade e são responsivas a estrógeno, que significa que possuem a capacidade de processarem o estrógeno sob a forma de estradiol via receptores de estrógeno localizados no citoplasma celular (LEVENSON, 1997).

Conhecendo os requisitos referentes ao emprego de nanocápsulas no tratamento de câncer, é necessário o estudo de suas propriedades, incluindo físico-químicas (diâmetro médio, distribuição de diâmetros, morfologia, química superficial, carga, características de adesão e erosão de superfície, porosidade interior, difusibilidade do ativo, eficiência de encapsulação, estabilidade do ativo e, cinética de liberação); biológicas (propriedade hemodinâmica, reconhecimento receptor-ligante-nanopartícula) e tumorais (pressão hidrostática e requisitos nutricionais) (FENG, 2004). Entretanto, apenas algumas das propriedades físico-químicas poderão ser controladas em nosso estudo.

Com o intuito de desenvolver um sistema carreador de antineoplásicos com características únicas quanto à forma de liberação, pretende-se desenvolver nanocápsulas poliméricas preparadas a partir do copolímero contendo DMAEMA (capítulo 1), que é pH-responsivo e poderá servir como um guindaste para o peptídeo LDV, permitindo a vetorização ativa às células tumorais mamárias. O LDV possui afinidade por integrinas específicas expressas pelas células tumorais, formando uma nanogrua que possibilitaria a entrega ativa do fármaco. Logo, faz-se necessário o estudo de caracterização físico-química deste sistema e, de seu comportamento em diferentes pHs, além da avaliação de sua citotoxicidade (não-vetorizado) frente às células de câncer.

9 REVISÃO DE LITERATURA DO CAPÍTULO 2

Nanopartículas na forma de nanoesferas ou nanocápsulas são sistemas submicrométricos, com tamanho nanométrico, que apresentam propriedades diferenciadas em relação à mesma substância no seu estado *bulk* e, capacidade de carrear fármacos ao sítio de ação (AUFFAN, 2009).

As nanoesferas são sistemas matriciais nos quais o fármaco encontra-se retido ou adsorvido em uma matriz polimérica enquanto que as nanocápsulas possuem um invólucro polimérico em torno de um núcleo oleoso líquido, estando o fármaco dissolvido no núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica (SCHAFFAZICK, 2003).

É relatado na literatura que nanocápsulas possuem vantagens em relação à nanoesferas e micropartículas quanto à estabilidade e, absorção celular, respectivamente (McCLEAN, 1998). A maior absorção celular foi encontrada com nanopartículas preparadas a partir de polímeros hidrofóbicos, enquanto as de superfície hidrofílica foram mais rapidamente eliminadas do organismo (JUNG, 2000). E, ainda, são vantajosas pelo aumento da biodisponibilidade, sustentação da liberação, carregamento de fármacos no núcleo (lipofilia) e possibilidade de vetorização.

Logo, nanocápsulas poliméricas podem ser preparadas por meio de dois principais métodos, sendo (GENNARO, 2005):

- Polimerização de monômeros dispersos: 1) polimerização em emulsão e; 2) polimerização interfacial de monômeros, também chamada de polimerização *in situ* de monômeros dispersos;
- Polimerização por precipitação de polímeros pré-formados: 1) nanoprecipitação, também chamada de deslocamento de solvente e; 2) emulsificação-difusão de solvente.

A nanoprecipitação é o método mais comumente empregado para o preparo de nanopartículas, no qual se adiciona o fármaco e um polímero dissolvido em um solvente orgânico parcialmente miscível em uma fase aquosa contendo tensoativo. A emulsificação e formação de nanoesferas ou nanocápsulas dependem da

ausência ou presença de óleo, respectivamente. Ressalta-se que para obterem-se partículas de dimensões nanométricas, é necessário o uso de um funil estreito para injeção da fase orgânica sobre a fase aquosa e, a injeção deve ocorrer de forma perpendicular, contínua e submersa na fase aquosa. Ao término do processo, o solvente (geralmente acetona) e o excesso de água é evaporado da suspensão.

A nanoprecipitação apresenta como vantagens a obtenção de alta eficiência de encapsulação (superior a 70%), reprodutibilidade de lotes, possibilidade de escalonamento, simplicidade e estreita distribuição de tamanho de partículas (RAO, 2011; REIS, 2006a; FESSI, 1988).

Uma vez desenvolvida a nanocápsula polimérica e caracterizada físico-quimicamente, deve-se pensar na encapsulação do fármaco e em sua liberação no organismo, dentro do tecido-alvo.

Várias são as literaturas que trazem métodos de doseamento validados para a quantificação de doxorrubicina e/ou seus metabólitos, entretanto, a maioria trata de amostras biológicas partindo de tecidos, sangue ou urina (WEI, 2008; AHMAD, 2011; SOTTANI, 2008; ASPEREN, 1998; BADEA, 2005; ALHRETH, 2012). Sendo assim, um novo método de quantificação da doxorrubicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) necessitou ser desenvolvido a fim de determinar sua encapsulação em nanopartículas, e foi baseado no estudo de Missirlis et al (2006).

A administração de uma suspensão de nanopartículas geralmente ocorre por via intravenosa em pacientes e, quando extravassa do vaso sanguíneo para um tecido, pode sofrer efeito EPR ou interagir com receptores celulares, o que acarretaria em (SINEK, 2004; FENG, 2004; GENNARO, 2005; CHO, 2008):

- endocitose mediada por receptor;
- internalização na forma de complexo receptor-ligante-nanopartícula ao endossomo celular onde será dissociada do receptor e reconhecida pela glicoproteína-P (Pgp, mecanismo I de resistência a fármacos), pois a nanopartícula seria circundada pela Pgp reduzindo a concentração intracelular de fármaco disponível à célula. Segue-se a liberação do ativo por mecanismo de difusão, entumescimento da matriz polimérica e erosão do polímero, seguido da degradação por lisossomas que geram fragmentos da nanopartícula e do fármaco os quais sofrem difusão para o citosol ou sítios específicos da célula, como o núcleo. Os fragmentos de polímero gerados sofrem biodegradação em torno de 1 ano no organismo, ou até mais, dependendo do polímero;

- transporte do complexo receptor-ligante-nanopartícula através da célula e liberação por exocitose em um local diferente do de entrada (transcitose) para o interstício tumoral (gel contendo colágeno como matriz tumoral) onde acumula-se tendo efeito de retenção. O tempo requerido para a difusão da partícula através do interstício é da ordem de dias para 1 mm de distância e de meses para 1 cm de distância.

É mencionado que a nanocápsula ideal deverá possuir superfície hidrofóbica para haver o escape aos macrófagos. Logo uma cobertura polimérica protege da opsonização (segundo mecanismo de resistência a fármacos) por repelir proteínas plasmáticas ou ela pode ser formada por copolímeros em bloco com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos. A porção hidrofílica auxilia na redução da opsonização, pois permite driblar a Pgp e permite a liberação do fármaco sem perdas no sítio alvo (CHO, 2008).

Logo, nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico estão sendo pesquisadas para diversas aplicações, principalmente como sistemas de liberação controlada de fármacos e de vetorização ativa pela capacidade de permitirem a funcionalização. Alguns estudos que exemplificam tais aplicações são descritos a seguir.

Rodriguez-Emmenegger e colaboradores (2011) desenvolveram uma nanocápsula com aplicação biomédica utilizando o metacrilato de monometoxi oligo(etileno glicol) com a superfície iniciada por ATRP em água e tampão fosfato salino prevenindo agregação protéica proveniente de fluídos biológicos.

Já para uma vetorização do fármaco a uma célula específica, tem-se realizado a adição de ligantes na superfície da partícula, entre eles o uso de poli(etileno glicol) (PEG), maleimida, N-hidroxisuccinimida (NHS), aminoácidos, proteínas e açúcares, entre outros intermediários (NICOLAS, 2006).

Bibby e colaboradores (2005) avaliaram a farmacocinética de nanopartículas contendo doxorubicina (250 μ g em equivalentes), preparadas a partir de metacrilato de multi-inulina contendo PEG-400 e RGD cíclico (arginina-glicina-ácido aspártico) como vetor para tumor mamário de murinho. Goutayer (2010) desenvolveu uma nanopartícula lipídica recoberta por poli(oxietileno)-maleimida-cRGD para vetorização de câncer atuando sobre integrina $\alpha_v\beta_3$, presente no endotélio vascular, sendo esta integrina um biomarcador de angiogênese.

Malam (2011) cita um trabalho do emprego de paclitaxel (150 $\mu\text{g/mL}$) em nanopartículas de DMAEMA/HEMA para câncer de mama, sendo observado a maior liberação do fármaco em pH ácido.

Como se pode observar, o emprego do metacrilato DMAEMA para o preparo de nanocápsulas tem sido pouco explorado, sendo que o mesmo apresenta-se como um polímero que responde a mudanças de temperatura e de pH do meio em que se encontra.

O estudo de Yuk (1997) investigou a transição de fase do copolímero PDMAEMA-co-etilacrilamida (EAAM) e seu comportamento em pH 4,0 e 7,4, explorando seu potencial como matriz para liberação controlada de insulina. Quando a temperatura do PDMAEMA em solução aquosa alcança 50°C o polímero precipita e com a incorporação do EAAM, a temperatura de solução crítica inferior (LCST) reduz-se devido a formação de ligações de hidrogênio, que protegem o DMAEMA da exposição à água resultando em contribuição hidrofóbica. Em pH 4,0 não observou-se a LCST para PDMAEMA pois seus grupamentos estão completamente ionizados, enquanto a LCST para o copolímero PDMAEMA-co-EAAM aumentou quando comparado ao isolado (PDMAEMA) ao ser exposto em pH 7,4.

Guo e colaboradores (2010) prepararam uma nanocápsula com PCL-g-PDMAEMA contendo paclitaxel e fragmentos de DNA. Demonstraram que o sistema é pH-responsivo e termo-responsivo, além de possibilitar uma liberação mais rápida do fármaco em pH ácido do que em pH neutro avaliado em células renais embrionárias humanas e que essa partícula pode servir para transfecção genética, pois permite o escape dos endossomos e a liberação no citoplasma celular.

Até o momento, o único estudo encontrado na literatura do emprego de DMAEMA na composição de nanocápsulas foi o de Penott-Chang et al (2012). Foram desenvolvidas nanocápsulas com uma blenda de PCL/PMMA-b-PDMAEMA contendo melatonina como antiinflamatório e anticancerígeno, visando administração via oral. Nesse estudo foi constatado que o PDMAEMA interage com a fase aquosa enquanto o PMMA e PCL situam-se voltados ao núcleo oleoso, tendo alguns fragmentos solubilizados no óleo. A estabilização do sistema é alcançada sem o uso de surfactantes lipofílicos.

Entretanto, o uso de um tribloco ao invés de blenda se torna vantajoso, pois garante a integridade da nanopartícula quando exposta a diferentes pHs devido a

presença de ligação química entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas, impedindo a quebra da estrutura.

A doxorubicina por sua vez, tem sido amplamente utilizada como fármaco carregado por diferentes tipos de nanopartículas, sendo algumas avaliadas em células de câncer de mama humano (MCF-7). Como exemplos, temos os estudos de Alkhatib e AlBishi (2013) no qual a doxorubicina (1 mg/mL) nas doses de 1 a 10 μ M foi carregada em uma nanoemulsão e mostrou-se menos citotóxica e mais eficaz às células tumorais (1,7 vezes de incremento) quando comparada a sua forma comercial.

Miao et al (2013) encapsularam paclitaxel e doxorubicina (0,3 mg/mL) em diferentes formulações de nanopartícula lipídicas sólidas (NLS) para avaliação biológica em células MCF-7 e MCF-7/ADR (resistentes a doxorubicina) por método MTT. O método de MTT é atualmente o método mais empregado para a avaliação de citotoxicidade de fármacos e sistemas de liberação de fármacos. Este ensaio colorimétrico rápido foi criado por Mosmann (1983) e envolve a capacidade de células viáveis converterem o sal de tetrazólio solúvel (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5 difenil tetrazólio, MTT) em precipitados de formazan insolúveis (formados em mitocôndria intacta). Os cristais de formazan podem ser dissolvidos em diferentes solventes orgânicos (ex. DMSO), gerando cor roxa e a densidade óptica resultante da solução é medida em espectrofotômetro multiparede (com leitor de placa para ELISA) (HANSENS, 1989; TWENTYMAN, 1987).

As nanopartículas desenvolvidas por Miao (2013) contendo doxorubicina apresentaram maior liberação (67%) em relação às de paclitaxel (42%, mesma dosagem) em 24 horas, justificada devido a maior lipofilicidade do paclitaxel que acarretou em uma liberação sustentada. E, a doxorubicina em nanopartículas aumentou 6 vezes seu efeito em relação às células resistentes (MCF-7/ADR), comparada às MCF-7 convencionais e ao fármaco (na forma cloridrato) em solução.

Huang et al (2013) realizou o estudo da encapsulação de doxorubicina em nanopartículas de selênio com a superfície modificada por transferrina, que atua como um mediador de endocitose. Com seu estudo foi possível identificar uma maior liberação do fármaco em pH ácido, além de que a presença da transferrina aumenta a captura celular por mecanismo mediado por claritina, bem como aumento a citotoxicidade frente as células de câncer (MCF-7) por indução da apoptose via p53

(gene supressor tumoral que regula o dano ao DNA) e MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno).

Ainda, a doxorubicina induz a morte celular por meio de três tipos de morte: senescência (associada à atividade de β -galactosidase, via p53/p21/WAF1, quando em baixa concentração), apoptose (via p53/Fas/caspase-8/caspase3, quando em concentração intermediária) e um tipo de necrose (via aumento da fosforilação da Akt, quando em elevada concentração) (REBBAA, 2003).

As células MCF-7 (deficientes em caspase-3) mostram-se resistentes aos quimioterápicos como a doxorubicina, mas uma vez tendo a reconstituição/ativação da caspase-3, esta acarreta em resposta apoptótica da doxorubicina (YANG, 2001). A doxorubicina atua então por meio de diferentes mecanismos citotóxicos como a indução de dano ao DNA por interação com topoisomerase II, levando a quebra do DNA, indução de alterações na membrana e geração de altas concentrações de ceramida e, mais recentemente, a regulação de sistema ligante Fas/Fas que se encontra envolvido no processo de morte celular (YANG, 2001).

Logo, o novo sistema proposto (nanocápsulas de PCL-b-P(MMA-DMAEMA)₂ carreador de doxorubicina) possui potencialidades terapêuticas, por uso de um tribloco estável a diferentes pHs, da possibilidade do acoplamento de um peptídeo à célula cancerígena e, da liberação de doxorubicina, de forma responsiva ao pH local, comprovando o conceito de nanogrua.

10 METODOLOGIA DO CAPÍTULO 2

10.1 MATERIAIS

Para tal foram empregados PCL 14 kDa ou copolímeros sintetizados (capítulo 1), Span 60[®] (Sigma-Aldrich –código S7010), Tween 80[®] (Alpha Química) e TCC (Embacaps). Acetona, etanol (Nuclear) e demais solventes p.a. foram adquiridos de diferentes fornecedores.

10.2 MÉTODOS

10.2.1 Preparação de nanocápsulas, estudo de pré-formulação e caracterização:

As formulações de nanocápsulas poliméricas foram preparadas com dois dos copolímeros PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ sintetizados: MLT-20 (método ATRP) e ARGET-A (método ATRP-ARGET-A).

Como formulação referencial utilizou-se a NC1, uma nanocápsula de PCL sem fármaco (branca), desenvolvida por Venturini e colaboradores (2011). A preparação de nanocápsulas foi realizada por nanoprecipitação, conforme Jäger (2009). A descrição geral do preparo segue abaixo:

Preparou-se uma fase oleosa contendo polímero, com ou sem monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) e 25 ou 30 mL de solvente orgânico (ex. acetona). Após a dissolução dos componentes, acrescentou-se triglicerídeo de cadeia média de ácidos cáprico e caprílico (TCC/Crodamol GTCC[®]). A fase oleosa foi mantida em banho-maria a 38°C sob agitação, até completa homogeneização. Na fase aquosa foi adicionado monoleato de polioxietilenossorbitano (Tween 80[®]/polissorbato 80) e 53 ou 60 mL de água MilliQ ou outro solvente aquoso. A fase aquosa foi igualmente mantida sob agitação em banho-maria a 38°C. Então, adicionou-se a fase oleosa na fase aquosa por injeção constante através de um funil de diâmetro de 2,5 mm e extremidade afunilada de 1,5 mm (medidos por régua). Manteve-se a suspensão em

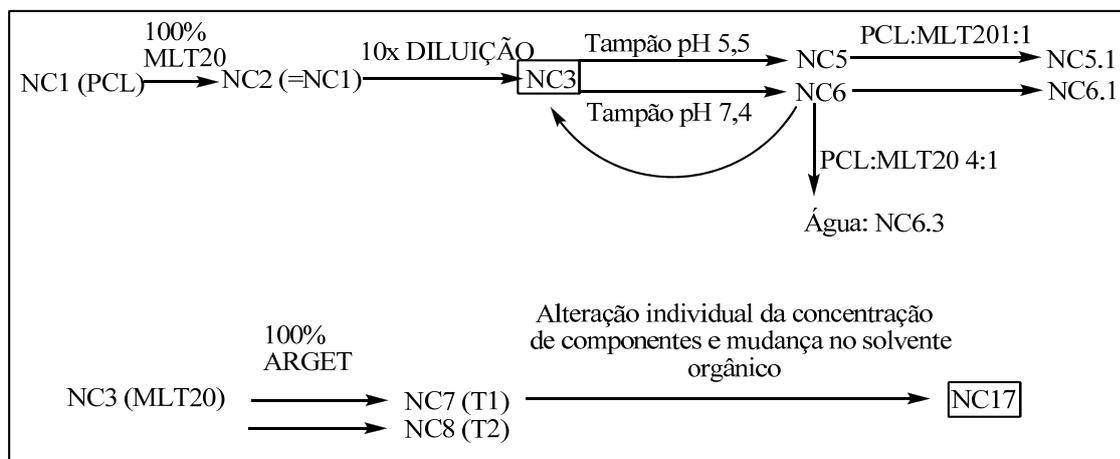
agitação em banho-maria durante 10 minutos e a formulação foi rotaevaporada para volume final (V.F.) de 10 ou 25 mL.

Para a preparação de algumas formulações e para a avaliação do comportamento da nanocápsula diante de variações de pH do meio foram empregadas soluções tampão cujo preparo segue:

- solução tampão fosfato de potássio pH 7,4: composta por 0,035 g de hidróxido de sódio (NaOH), 0,153 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em 200 mL de água MilliQ. O ajuste de pH foi realizado com solução NaOH a 0,1 M.

- solução tampão fosfato de potássio pH 5,5: composta por 0,4 g de fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4), 1,6 g de fosfato de potássio monobásico em 200 mL de água MilliQ. O ajuste de pH foi realizado com solução de ácido clorídrico a 0,1 M (FBras, 1988).

As formulações desenvolvidas por nanoprecipitação foram produzidas conforme o fluxograma abaixo:



Esquema 5. Protocolo de desenvolvimento de formulações.

A seguir, apresentam-se as formulações desenvolvidas a partir do copolímero MLT20, preparado por ATRP, na Tabela 3.

Tabela 3: Formulações de nanopartículas com copolímero MLT20 (método ATRP).

Formulação	NC2	NC3	NC5	NC6	NC5.1	NC6.1	NC6.3
Polímero:	0,1 g MLT20	0,010 g MLT20	0,010 g MLT20	0,010 g MLT20	0,025g PCL: 0,025g MLT20	0,025g PCL: 0,025g MLT20	0,04g PCL: 0,01g MLT20
Span 60 [®]	0,04 g	0,004 g	0,004 g	0,004 g	0,02 g	0,02 g	0,02 g
TCC	0,160 g	0,016 g	0,016 g	0,016 g	0,08 g	0,08 g	0,08 g
Acetona	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
Tween 80 [®]	0,08 g	0,008 g	0,008 g	0,008 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Solvente (53 mL)	Água	Água	tampão pH 5,5	tampão pH 7,4	tampão pH 5,5	tampão pH 7,4	Água
Volume Final	10 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL

A formulação NC2 é a mesma formulação NC1 (Venturini, 2011), entretanto ao invés de empregar PCL como polímero utilizou-se o copolímero MLT20. As próximas formulações, NC3, NC5 e NC6, empregaram concentrações 10 vezes reduzidas dos componentes (baseado em Bianchin (2012), visando a otimização da distribuição granulométrica e, emprego de menor quantidade de copolímero já que a síntese demanda tempo de preparo. NC5 e NC6 ainda tiveram a modificação no solvente da fase aquosa, substituindo a água por soluções tampão, objetivando a administração intravenosa de uma formulação estável quanto ao diâmetro médio de partículas. As formulações NC5.1 e NC6.1 empregaram como componente polimérico uma mistura 1:1 (p/p) de PCL:MLT20 e testou-se ainda a formulação NC6.3 com PCL:MLT20 4:1 (0,04 g de PCL:0,01 g de MLT20). Estas foram desenvolvidas a fim de verificar se o uso de proporções de polímero influenciaria no perfil de distribuição de partículas.

Com base nos resultados obtidos, retornou-se a formulação NC3 e, testou-se a mesma sem tensoativo lipofílico, uma vez que o copolímero é anfifílico (NC3F2).

A seguir, prepararam-se formulações com o copolímero ARGET-A (ATRP-ARGET), baseadas em NC3, chamadas de NC7 (T1) e NC8 (T2). Na tentativa de excluir o tensoativo hidrofílico, preparou-se a formulação NC9, com grande redução na quantidade deste componente. Após várias modificações nas quantidades de polímero, óleo e tensoativo hidrofílico e, excluindo-se o tensoativo lipofílico, desenvolveu-se a formulação NC17 (Tabela 4).

Tabela 4. Formulações preparadas com copolímero ARGET-A (método ATRP-ARGET).

Formulação	NC7	NC8	NC9	NC17
Polímero: ARGET	0,01 g (T1)	0,01 g (T2)	0,01 g (T2)	0,03 g (T2)
Span 60 [®]	0,004 g	0,004 g	0,004 g	0 g
TCC	0,016 g	0,016 g	0,016 g	0,05 g
Solvente	25 mL acetona	25 mL acetona	25 mL acetona	30 mL acetona:etanol 50:50 (v/v)
Tween 80 [®]	0,008 g	0,008 g	0,0008 g	0,05 g
Água	53 mL	53 mL	53 mL	60 mL
Volume final	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

10.2.2 Caracterização das partículas e avaliação da responsividade frente a alterações de pH:

As nanocápsulas foram avaliadas quanto ao pH (pHmetro Denver Instrument UB-10 Ultrabasic) e viscosidade (viscosímetro vibracionar RS-Visco SV-10). Posteriormente, o perfil de distribuição granulométrico foi determinado por difração a laser usando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments), utilizando água destilada como meio dispersante em temperatura ambiente.

Para as formulações desenvolvidas no estudo de pré-formulação, utilizou-se o índice de refração da PCL (IR = 1,59) e, para as formulações que foram submetidas à avaliação biológica, utilizou-se o índice de refração de 1,437 para o copolímero MLT20, 1,431 para o copolímero ARGET-A e 1,442 para o copolímero ARGET-B, previamente determinados por refratômetro de Abbe.

A seguir, procedeu-se a análise por espalhamento dinâmico de luz para a avaliação do tamanho de partícula médio e, por mobilidade eletroforética, determinou-se o potencial zeta (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). As amostras foram diluídas 500 vezes (20 μ L/10ml) em água MilliQ ou em solução de cloreto de sódio a 10 mM, respectivamente, utilizando cubetas adequadas para cada análise.

Para a análise da responsividade frente ao pH, as formulações foram diluídas em soluções tampão fosfato de potássio pH 7,4 e pH 5,5, sendo os resultados avaliados por volume, intensidade e número.

10.2.3 Encapsulação de doxorubicina:

A concentração de doxorubicina a ser encapsulada nas nanopartículas foi determinada após a avaliação do IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% de crescimento celular) de uma solução aquosa de cloridrato de doxorubicina sobre células de câncer de mama humano (MCF-7) por método brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT).

A avaliação do IC₅₀ foi executada com a preparação de três soluções-mãe: SM1 = 29 µg/mL, SM2 = 11,6 µg/mL e SM3 = 2,32 µg/mL. Partindo destas, foram preparadas 8 diluições em ependorfes previamente esterilizados utilizando como veículo o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified eagle médium*, volume final = 450 µL) para serem então aplicados 100 µL nos poços contendo as células MCF-7 (concentrações: 0,0035, 0,034, 0,177, 0,355, 1,73, 3,51, 5,29 e 7,02 µM, n=1, quadruplicate).

Após conhecer o valor do IC₅₀, uma solução do cloridrato de doxorubicina (1,467 mg/mL) foi submetido à extração com trietilamina (1,3 equivalentes) em diclorometano conforme a metodologia de Lince et al (2011). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada, obtendo 0,9794 mg de fármaco seco (rendimento de 71,23% (mol)). A seguir, preparou-se uma solução de doxorubicina (sem cloridrato) em diclorometano a 35,99 mM (0,9794 mg/50 µL), para ser utilizada no preparo de nanopartículas.

Foram preparadas novas formulações contendo ou não doxorubicina, visando à avaliação biológica, conforme segue na Tabela 5.

Tabela 5. Formulações empregadas no estudo de atividade biológica.

Componentes	1-NC	1-NC-Dox	2-NC	2-NC-Dox
Polímero	0,0341 g ARGET-A	0,0349 g ARGET-A	0,0331 g ARGET-B	0,0304 g ARGET-B
Óleo (TCC)	0,0574 g	0,0491 g	0,0535 g	0,0522 g
Doxorubicina	0	5 µg/mL (2,55 µL)	0	10 µg/mL (5,11 µL)
Acetona:etanol 1:1 (v/v, mL)	30	30	30	30
Tween 80®	0,0538 g	0,0557 g	0,0517 g	0,0514 g
Água (mL)	60	60	60	60
Volume final (mL)	10	10	10	10

As doses de doxorubicina incorporadas nas formulações foram definidas, com base no valor de IC_{50} e, considerando a extração do cloridrato da doxorubicina e sua diluição em diclorometano, definiu-se 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ devido ao mínimo volume mensurável possível de ser aplicado utilizando uma seringa de vidro.

10.2.4 Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de doxorubicina nas nanopartículas:

A metodologia para quantificação da doxorubicina a partir de nanopartículas foi adaptada do trabalho de Missirlis et al (2006). Empregou-se um equipamento Perkin Elmer Series 200, com pré-coluna Cartridges C18 (4.0 x 3.0 mm, Phenomenex), uma coluna RP-18 (150 mm x 4.6 mm x 5 μm ODS2 Waters, Spherisorb[®]), fase móvel composta de ácido trifluoracético a 0,1%:acetonitrila 1:1 (v/v) com $\text{pH}=2.65$, fluxo de 1.0 mL/min, volume de injeção de 150 μL em 254 nm.

Uma solução mãe do cloridrato de doxorubicina foi preparada a 20 $\mu\text{g/mL}$ em água MilliQ, sendo diluída para obter os pontos 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$ da curva analítica (n=3, triplicata).

Foram avaliados os parâmetros: linearidade, especificidade, exatidão, precisão (intermediária e repetibilidade) e limites de detecção e quantificação, conforme os critérios da ANVISA (RE 899, 29/05/2003) e *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

10.2.4.1 Linearidade:

É a capacidade de obtenção de resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em uma determinada faixa de variação, por meio da medida de 5 concentrações de uma curva, perfazendo três curvas analisadas em dias diferentes e consecutivos (ICH, 2005). Os resultados das áreas coletadas não necessitaram correção quanto a pureza do fármaco, uma vez que a doxorubicina utilizada é relatada pelo fabricante sendo 98 a 102% de pureza (Sigma D1515). Os resultados forneceram a equação de reta e o coeficiente de regressão linear (R^2), sendo a análise estatística realizada por análise de variância (ANOVA, fator único) e análise de regressão em nível de significância de 95% ($p<0,05$).

10.2.4.2. Especificidade:

A especificidade é definida como a capacidade de determinar o analito, inequivocadamente, em presença de excipientes, impurezas ou produtos de degradação (ICH, 2005). Para a avaliação da especificidade, foram preparadas diluições das nanopartículas 1-NC e 2-NC (500 µL/1 mL de tetrahidrofurano/qps para 5 mL em acetonitrila), filtradas com filtro 0,45 µm e transferidas para vials.

10.2.4.3. Exatidão:

A exatidão expressa a proximidade entre o valor aceito como referência e o valor encontrado, sendo realizada pela porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado à amostra (ANVISA, 2003). A exatidão foi medida para as formulações 1-NC-Dox e 2-NC-Dox, conforme os protocolos da Tabela 6.

Tabela 6. Protocolo de exatidão para 1-NC-Dox por CLAE, 254 nm.

Solução	1-NC-Dox _{5µg/mL}			Sol. Doxorrubicina 5 µg/mL			Massa em 5 mL (µg)	Conc. (%)	Conc. Teórica (µg/mL)
	Alíquota (mL)	Conc. (µg/mL)	Massa (µg)	Alíquota (mL)	Conc. (µg/mL)	Massa (µg)			
S1	0,5	0,5	2,5	0,25	0,25	1,25	1,75	75	0,75
S2	0,5	0,5	2,5	0,5	0,5	2,5	5,0	100	1,0
S3	0,5	0,5	2,5	0,75	0,75	3,75	6,25	125	1,25

Todas as diluições foram preparadas em 1 mL de tetrahidrofurano/qps para 5 mL em acetonitrila, foram agitadas por turrax durante 5 minutos, filtradas com filtro 0,45 µm e transferidas para vials. Abaixo segue o protocolo para 2-NC-Dox (Tabela 7).

Tabela 7. Protocolo de exatidão para 2-NC-Dox por CLAE, 254 nm.

Solução	2-NC-Dox _{10µg/mL}			Sol. Doxorubicina 5 µg/mL			Massa em 5 mL (µg)	Conc. (%)	Conc. Teórica (µg/mL)
	Alíquota (mL)	Conc. (µg/mL)	Massa (µg)	Alíquota (mL)	Conc. (µg/mL)	Massa (µg)			
S1	0,5	1,0	5,0	0,5	0,5	2,5	7,5	75	1,5
S2	0,5	1,0	5,0	1	1,0	5,0	10,0	100	2,0
S3	0,5	1,0	5,0	1,5	1,5	7,5	12,5	125	2,5

10.2.4.4. Precisão intermediária ou inter-dia:

A precisão intermediária avalia a concordância das medidas da concentração intermediária (5 µg/mL), em triplicata, em diferentes dias, com diferentes analistas ou equipamentos (ANVISA, 2003).

10.2.4.5. Precisão intra-dia ou repetibilidade:

A repetibilidade expressa a precisão sob as mesmas condições de operação durante um pequeno intervalo de tempo, sendo realizada por seis medidas do ponto intermediário (5 µg/mL), em um mesmo dia, realizadas por um mesmo analista (ANVISA, 2003).

10.2.4.6. Limites de detecção e quantificação:

O limite de detecção é a menor quantidade de uma analito na amostra capaz de ser detectável, mas não necessariamente quantificado com um valor exato. Enquanto o limite de quantificação é a menor massa de analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas (ICH, 2005; ANVISA, 2003). Os limites (LD e LQ) são calculados pela razão entre o desvio padrão da intercepção e a média da inclinação das curvas, multiplicados por 3 e 10, respectivamente.

10.2.4.7. Quantificação de doxorubicina em nanopartículas:

As formulações 1-NC-Dox and 2-NC-Dox foram submetidas ao método de ultrafiltração-centrifugação utilizando um dispositivo de 10 kDa. A centrifugação foi executada durante 10 minutos a 5000 rpm, sendo o ultrafiltrado transferido

diretamente para um vial, sem prévia diluição, para a quantificação do fármaco livre (n=3). Foram calculados os parâmetros eficiência de encapsulação (EE, *encapsulation efficiency*), carregamento de fármaco (DL, *drug loading*) e conteúdo de fármaco (DC, *drug content*).

10.2.5. Avaliação biológica das nanopartículas:

As células de câncer de mama humano (MCF-7, ATCC[®]-HTB-22[™] Rockville, MD) foram mantidas em placa de 96 poços (1250 células/poço) com meio de cultura DMEM, contendo baixa glicose, 10% soro fetal bovino, 0,1% de amfotericina, 1% penicilina/estreptomicina a 37°C, 5% CO₂/95% O₂, durante 48 horas antes da aplicação dos tratamentos (número de células em torno de 20.000).

A seguir os tratamentos são aplicados, sendo:

- formulações 1-NC e 1-NC-Dox aplicadas em volumes variando de 0,5 a 20% por poço (n=3, triplicata);
- os excipientes das formulações foram avaliados por meio do preparo das seguintes soluções: TCC 5mg/mL em DMSO, PMMA 3 mg/mL em DMSO (síntese e caracterização em anexos), PDMAEMA 3 mg/mL (síntese e caracterização em anexos), polissorbato 80 a 5 mg/mL e nanoesferas de PCL (formulação 1-NC, sem TCC). Estas soluções foram aplicadas em volumes variando de 0.5 to 2% por poço (n=1, triplicata);
- formulações 2-NC e 2-NC-Dox foram aplicados em volumes variando de 0,5 a 20% por poço (n=3, triplicata) e;
- solução de cloridrato de doxorubicina nas mesmas concentrações em que a doxorubicina foi aplicada a partir de nanocápsulas (objetivando a comparação de resultados).

Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e 100 µL/poço de uma solução do reagente MTT (diluído 1:9 v/v em tampão fosfato de potássio pH 7,4, PBS) foi adicionado, incubado por 3 horas e substituído por dimetilsulfóxido (DMSO, 100 µL/poço). A absorbância foi lida em 570 e 630 nm (SpectraMax M2, Molecular Devices). E, os resultados obtidos foram avaliados por ANOVA e teste Tukey (p<0.05).

11 RESULTADOS DO CAPÍTULO 2

11.1. RESULTADOS DO ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS A PARTIR DO COPOLÍMERO PCL-P(MMA-DMAEMA)₂

As oito formulações foram preparadas com o copolímero MLT20 (ATRP) e foram avaliadas por difração a laser, sendo os perfis de distribuição granulométrica expostos na Figura 45.

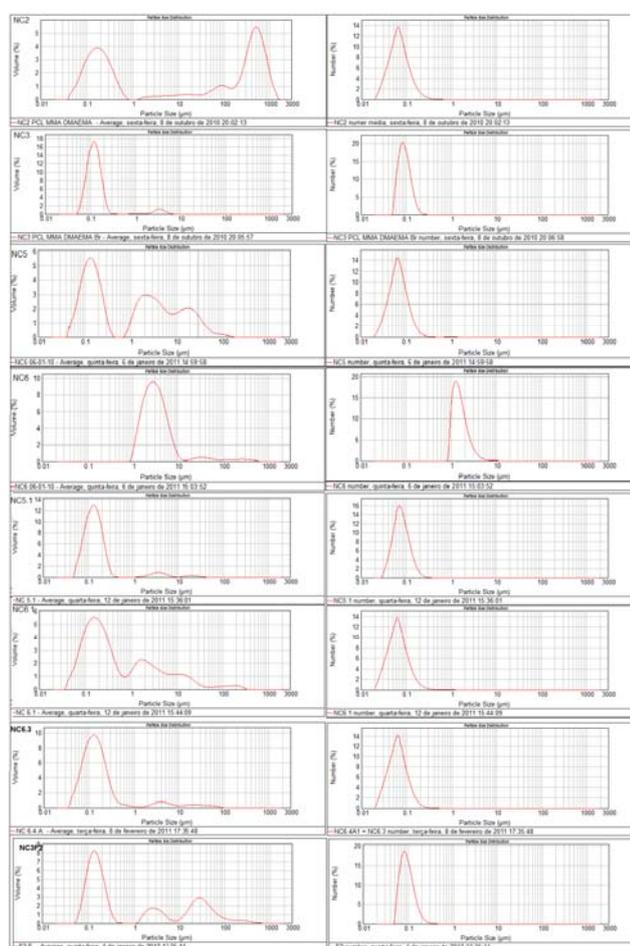


Figura 45. Perfil de distribuição de tamanho de partícula por difração a laser para nanopartículas preparadas a partir do copolímero sintetizado por ATRP: NC2 (linha 1), NC3 (linha 2), NC5 (linha 3), NC6 (linha 4), NC5.1 (linha 5), NC6.1 (linha 6), NC6.3 (linha 7) e NC3F2 (linha 8), representadas em volume (esquerda) e em número (direita).

Das formulações preparadas com o copolímero MLT20, nenhuma foi avaliada quanto ao pH e somente as formulações preparadas em tampão foram avaliadas quanto a viscosidade vibracional. A viscosidade foi de 0,71 mPas/26,6°C para NC5, 0,67 mPas/25,8°C para NC6, 0,80 mPas/26,6°C para NC5.1 e 0,73 mPas/26,6°C para NC6.1. Devido aos valores de viscosidade serem inferiores a 1,00 mPas/20°C (viscosidade da água), foi cogitado haver resíduos de acetona (0,32 mPas/20°C) na formulação não retirados totalmente no rotaevaporador quando o volume final foi de 25 mL. Uma vez que a água MilliQ utilizada no preparo das formulações apresentou 0,81mPas/20,2°C de viscosidade, esta possibilidade torna-se reduzida, já que se parte de água com baixa viscosidade.

Como se pode observar, a formulação NC6 preparada em tampão fosfato de potássio pH 7,4 apresentou-se totalmente micrométrica, seguida das demais formulações com perfis heterogêneos (nanométricos e micrométricos). As melhores formulações obtidas foram NC3, NC5.1 e NC6.3, cuja fração micrométrica tornou-se reduzida devido a diminuição na quantidade de copolímero MLT20 empregado para o preparo da formulação. Conclui-se que o copolímero MLT20 possui um bloco grande composto de unidades monoméricas e, devido a isto, necessita da redução em sua concentração na formulação de nanocápsulas.

A fração micrométrica observada em NC3 possivelmente foi em função da quantidade de tensoativos utilizados na formulação ou, do tamanho do bloco do copolímero. A formulação NC3 apresentou valor de Span de 0,972 e 0,792, por volume e número, respectivamente. A formulação NC5.1 apresentou valor de Span de 1,389 e 1,088 e, NC6.3 obteve 8,056 e 1,275, por volume e número.

A formulação NC3 foi então considerada melhor formulação contendo o copolímero MLT20 e foi submetida à técnica de espalhamento dinâmico de luz, apresentando diâmetro médio de 143,7 nm, com índice de polidispersividade (PDI) de 0,131 e potencial zeta de +6,94 mV, sendo o DMAEMA, o responsável pela positividade do potencial zeta.

Com o objetivo de eliminar o tensoativo lipofílico, desenvolveu-se a formulação NC3, sem conter o Span 60[®], sendo chamada de NC3F2, que apesar de fornecer uma formulação nanométrica e micrométrica, foi (juntamente com a NC3) avaliada por espalhamento dinâmico de luz quanto as modificações de diâmetros frente à exposição em meios com diferentes pHs (Tabela 8). As mesmas foram comparadas a formulação NC1 (PCL).

Tabela 8. Diâmetros de partícula de NC1, NC3 e NC3F2 em diferentes pHs avaliadas por espalhamento dinâmico de luz (n=1).

Formulação/solvente (20µl/10ml)	Diâmetro médio (nm)	PDI
NC1/água MilliQ	230,8	0,179
NC1/tampão fosfato de potássio pH 7,4	224,6	0,169
NC1/tampão fosfato de potássio pH 5,5	240,5	0,196
NC3/água MilliQ	143,7	0,131
NC3/tampão fosfato de potássio pH 7,4	138,4	0,144
NC3/tampão fosfato de potássio pH 5,5	576,2	0,425
NC3F2/água MilliQ	62,68	0,344
NC3F2/tampão fosfato de potássio pH 7,4	87,75	0,155
NC3F2/tampão fosfato de potássio pH 5,5	547,9	0,371

Conforme se pode observar não houve alteração no tamanho de partícula da formulação NC1 quando exposta a diferentes pHs, uma vez que a PCL não possui grupo químico capaz de expansão mediante pH ácido.

Verifica-se que as formulações com o copolímero compravam a propriedade de que o DMAEMA em sua composição, torna a nanocápsula pH-responsiva. A ausência de Span 60[®] na formulação não afeta a expansão do tamanho de partícula mediante pH 5,5, mas prejudicou o perfil granulométrico em NC3F2. Ainda, é mostrada na Figura 46, a comparação destas três formulações quanto à expansão na forma de gráfico de dispersão.

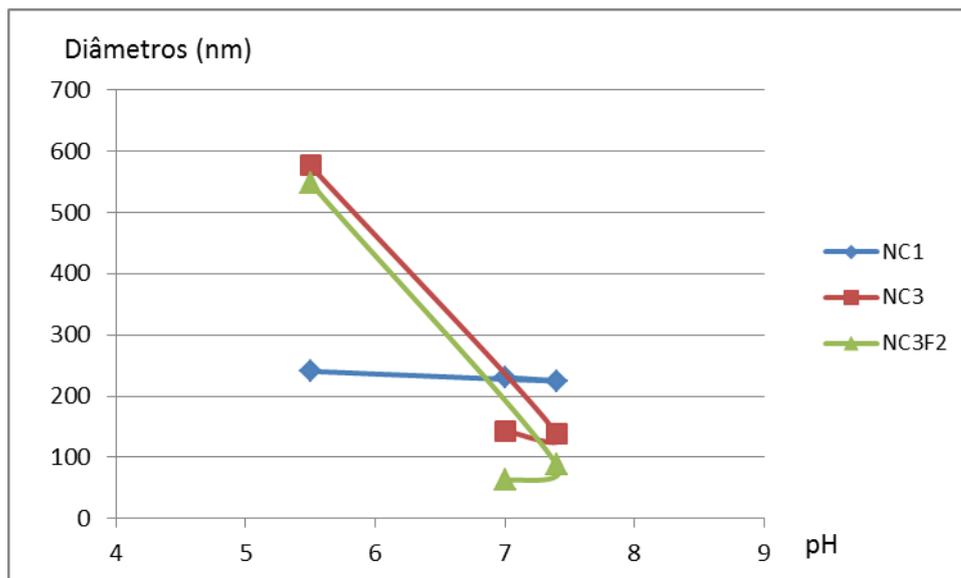


Figura 46. Alterações de diâmetros médios de formulações NC1, NC3 e NC3F2 mediante mudanças de pH.

O copolímero MLT20, componente da NC3, é composto por 67 unidades de CL:16 unidades de DMAEMA:6 unidades de MMA, justificando o aumento de tamanho de partícula frente ao pH ácido.

A avaliação da responsividade do tamanho de partícula frente a alterações de pH realizada por espalhamento dinâmico de luz está apresentada abaixo (Figura 47).

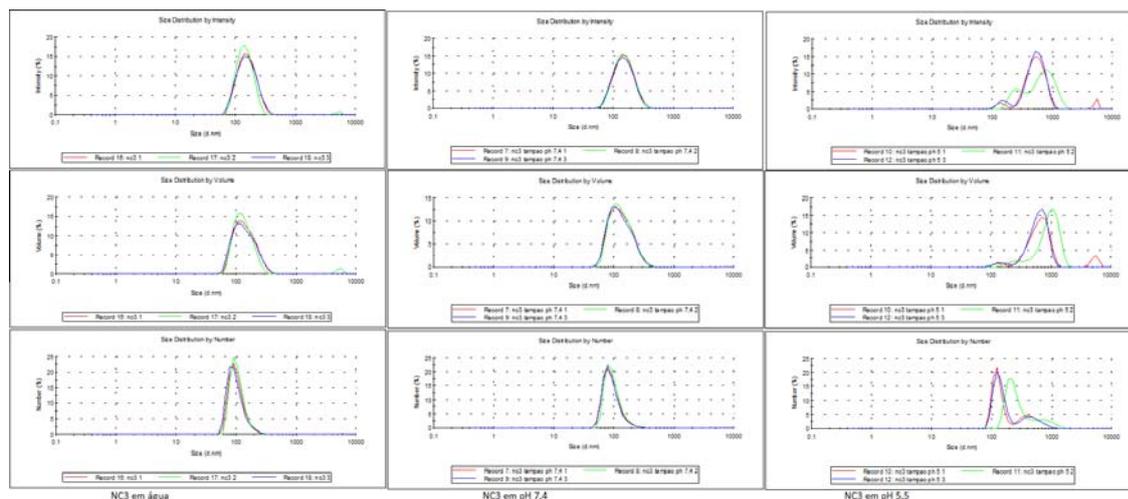


Figura 47. Perfil de distribuição de partícula por espalhamento dinâmico de luz para NC3 diluída em água (coluna esquerda), tampão fosfato de potássio pH 7,4 (coluna central) e tampão fosfato de potássio pH 5,5 (coluna direita) em intensidade (linha superior), volume (linha intermediária) e número (linha inferior).

Com esta análise pode-se observar o deslocamento da distribuição de diâmetros para valores maiores e, uma variação entre as leituras, uma vez que a expansão de diâmetro frente ao pH ácido ocorre de forma dependente do tempo de exposição no meio em que se encontra diluída. Aqui, todas as amostras foram diluídas no momento da análise e foi mantido o mesmo intervalo para a leitura no equipamento.

Também foram desenvolvidas sete formulações a partir do copolímero ARGET-A (ATRP-ARGET-A). As primeiras formulações, NC7 (T1) e NC8 (T2), foram baseadas em NC3, sendo rotaevaporada para volume final de 10 mL.

O pH e a viscosidade não foram analisadas para a formulação NC7, enquanto que a NC8 apresentou pH de 6,61 e a viscosidade de 1,04 mPas a 20,5°C.

Na tentativa de reduzir o tensoativo hidrofílico, desenvolveu-se a formulação NC9 e, após várias modificações nas quantidades de polímero, óleo e tensoativo hidrofílico, com a retirada total do tensoativo lipofílico, alcançou-se a formulação NC17. A seguir, são expostos os perfis destas formulações avaliados por difração a laser (Figura 48).

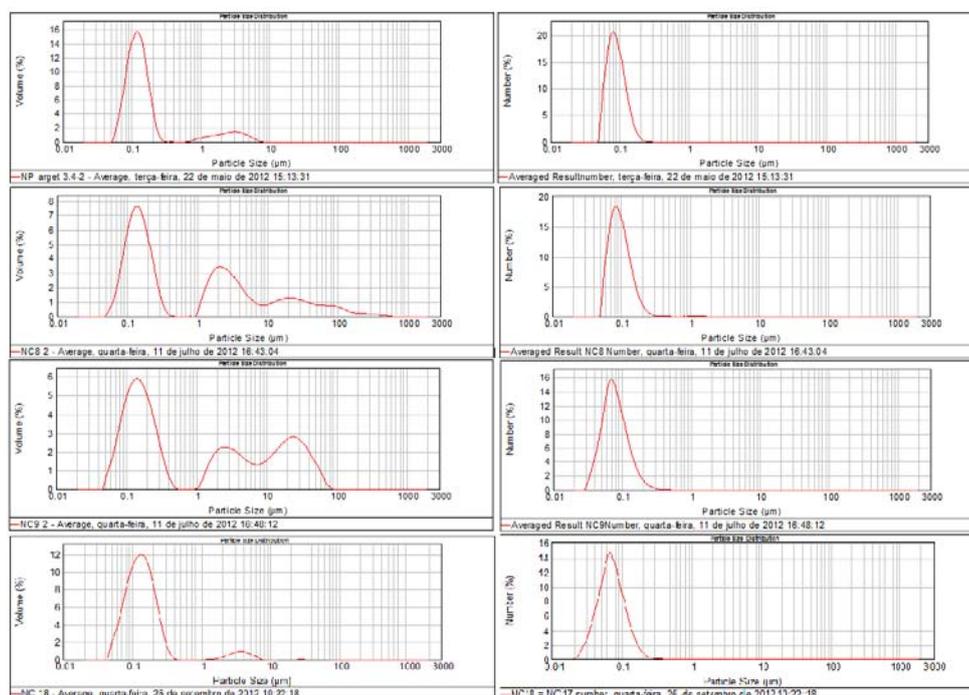


Figura 48. Perfil de distribuição de tamanho de partícula por difração a laser para formulações preparadas a partir do copolímero produzido por ATRP-ARGET-A: NC7 (linha 1), NC8 (linha 2), NC9 (linha 3) e NC17 (linha 4), por volume (esquerda) e número (direita).

As formulações NC7 e NC17 apresentaram um perfil majoritário nanométrico e pequena população micrométrica, enquanto a NC8 e NC9 apresentaram-se heterogêneas. A redução no polissorbató 80 prejudicou a distribuição granulométrica, demonstrando que apesar do copolímero ser formado por materiais de carácter hidrofílico e lipofílico, necessita de tensoativo para a estabilização das fases. Logo, a organização da nanocápsula envolve o óleo sendo rodeado pelo bloco polimérico e este por polissorbató 80.

A análise de difração a laser apresenta, para NC7, valores de Span de 12,074 e 0,786 e para NC17, Span de 1,504 e 1,214, por volume e número, respectivamente.

Ressalta-se que durante o preparo da suspensão de nanopartículas com o copolímero ARGET-A, foi observado a solubilidade parcial do copolímero em acetona, prévio a injeção da fase orgânica na aquosa. Quando a fase orgânica foi injetada sobre a fase aquosa este se tornou totalmente solúvel. Isto demonstra que o copolímero constituído de PCL-b-P(MMA-DMAEMA)₂ é parcialmente solúvel em acetona devido a presença de MMA e PCL e parcialmente solúvel em água pela presença de DMAEMA. Devido a esta observação, a formulação NC17 foi desenvolvida em acetona:etanol 1:1 (v/v), demonstrando ser mais homogênea em relação ao diâmetros nanométricos.

Essas formulações foram avaliadas quanto ao potencial zeta, sendo obtido para NC7 e NC17, +12,2 mV e +21,5 mV, respectivamente. Os resultados quando ao tamanho, está listado na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz para NC7 e NC17.

Formulação (20 µL/10mL)	Diâmetro médio (nm)	PDI
NC7/água MilliQ	112,9	0,214
NC7/tampão fosfato de potássio pH 7,4	199,0	0,321
NC7/tampão fosfato de potássio pH 5,0	278,1	0,414
NC17/água MilliQ	69.8	0.226
NC17/tampão fosfato de potássio pH 7,4	73.4	0.237
NC17/tampão fosfato de potássio pH 5,5	96.2	0.259

Observa-se que no caso do copolímero ARGET-A empregado em nanopartículas, a expansão de diâmetros ocorreu de forma mais branda que com o copolímero MLT20 (ATRP), uma vez que temos menor número de unidades monoméricas de DMAEMA no bloco.

O copolímero ARGET-A contém 67 unidades CL:6 unidades de DMAEMA:0,12 unidades de MMA no copolímero, justificando o comportamento observado.

Na Figura 49 encontra-se o perfil de distribuição de tamanho de partículas para NC7 e NC17, por espalhamento dinâmico de luz.

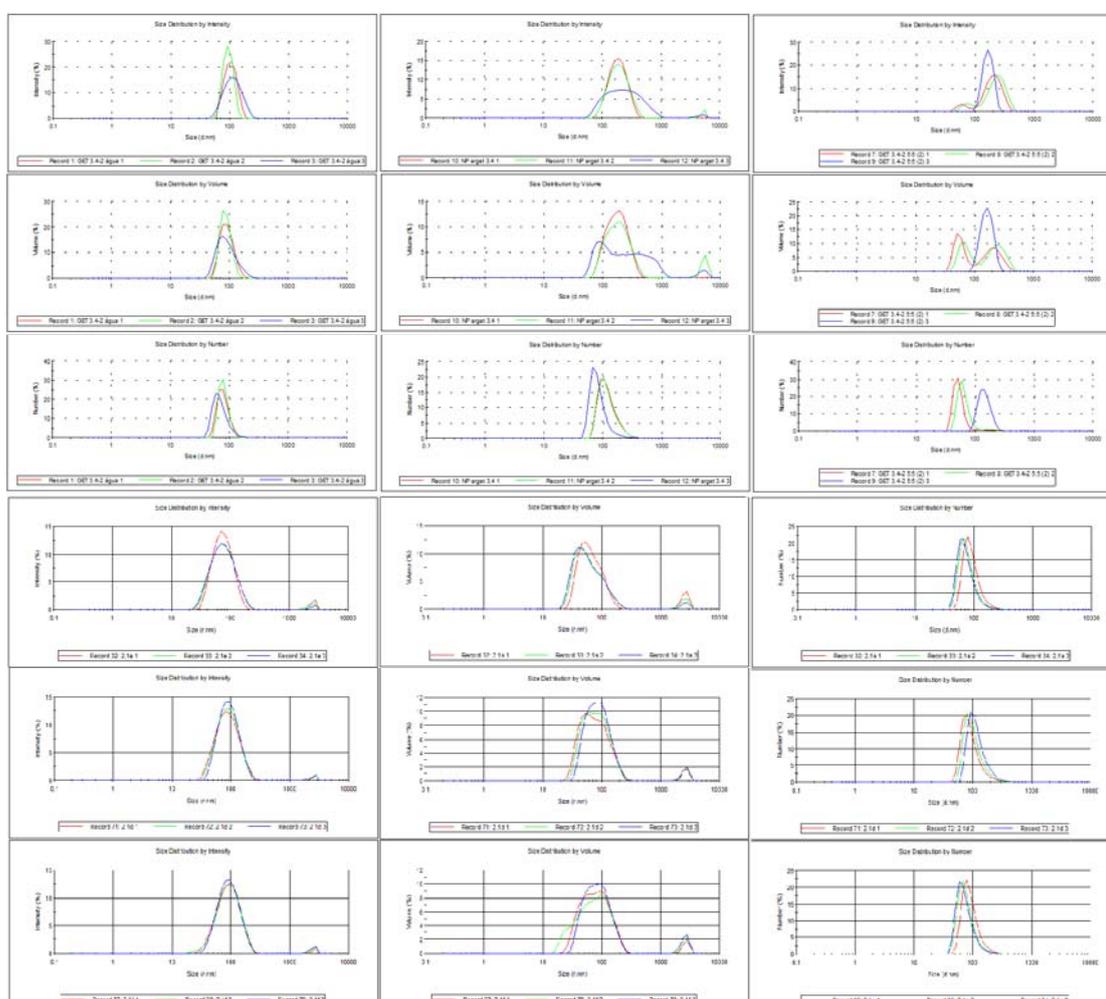


Figura 49. Perfil de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz para NC7 diluída em água (linha 1), tampão fosfato de potássio pH 7,4 (linha 2) e pH 5,5 (linha 3); NC17 em água (linha 4), em pH 7,4 (linha 5) e pH 5,5 (linha 6), por intensidade (esquerda), volume (central) e número (direita).

Em ambas as formulações observam-se deslocamentos das medidas realizadas na amostra, em todas as diferentes diluições. Logo, a formulação NC17

foi a melhor formulação para o copolímero ARGET-A e é preferencial a NC3 (copolímero MLT20, ATRP), pois é composta por menor quantidade de excipientes, e desenvolvida a partir de um copolímero obtido por um método sintético mais prático e menos dispendioso economicamente.

Ainda, as nanocápsulas produzidas com ambos os copolímeros responderam a alterações de pH, mostrando expansão no diâmetro de partícula quando diluídas em solução tampão fosfato de potássio pH 5,5, confirmando a proposta de emprego do copolímero em carreadores pH-responsivos.

11.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS SUBMETIDAS À AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

A determinação do IC₅₀ da doxorubicina (sob a forma de cloridrato) foi avaliada em células MCF-7 por ensaio de MTT de 24 horas. Foi encontrado o valor de 4,77 $\mu\text{M} \pm 0,05$, que equivale a 2,76 $\mu\text{g/mL}$ (n=1, quadruplicata, Figura 50).

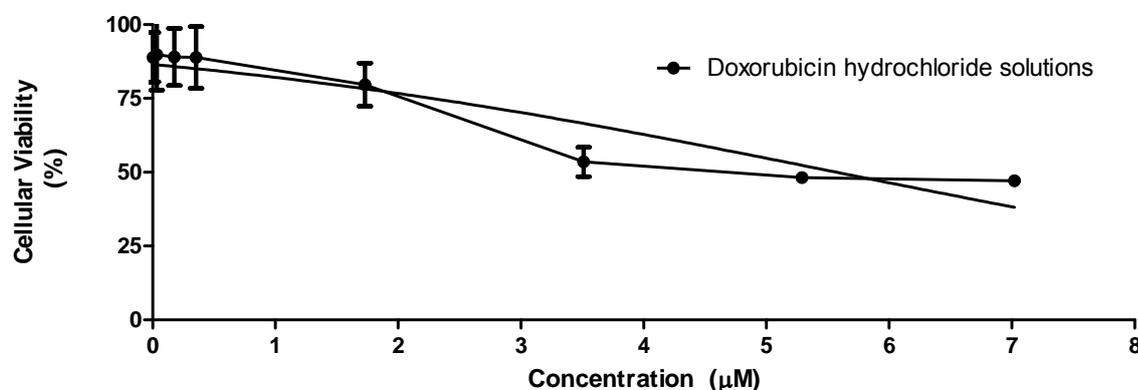


Figura 50. Determinação do IC₅₀ de soluções do cloridrato de doxorubicina em células MCF-7 por método MTT, 24 horas (n=1, quadruplicata).

A análise estatística foi realizada por ANOVA (*one way*), obtendo o $R^2=0,956$ e $p=1,17 \cdot 10^{-7}$, com valor de $F_{\text{calculado}}$ foi de 16,39, $F_{\text{crítico}}$ foi 2,64 e grau de liberdade (GL) de 4 entre grupos (solução do cloridrato de doxorubicina e meio de cultura), confirmando a significância estatística para 95% de confiança.

Partindo do valor do IC₅₀, o cloridrato de doxorubicina foi extraído conforme Lince (2011) e a doxorubicina foi então incorporada nas formulações conforme segue: a formulação 1-NC-Dox (copolímero ARGET-A) foi preparada com

doxorrubicina a 5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a formulação 2-NC-Dox (copolímero ARGET-B) foi produzida com 10 $\mu\text{g/mL}$.

Da mesma forma, foram produzidas as respectivas nanocápsulas brancas (sem doxorrubicina), cuja análise de difração a laser é apresentada abaixo (Figura 51), com os respectivos índices de refração (IR) dos copolímeros ($IR_{\text{ARGET-A}} = 1,431$ e $IR_{\text{ARGET-B}} = 1,442$).

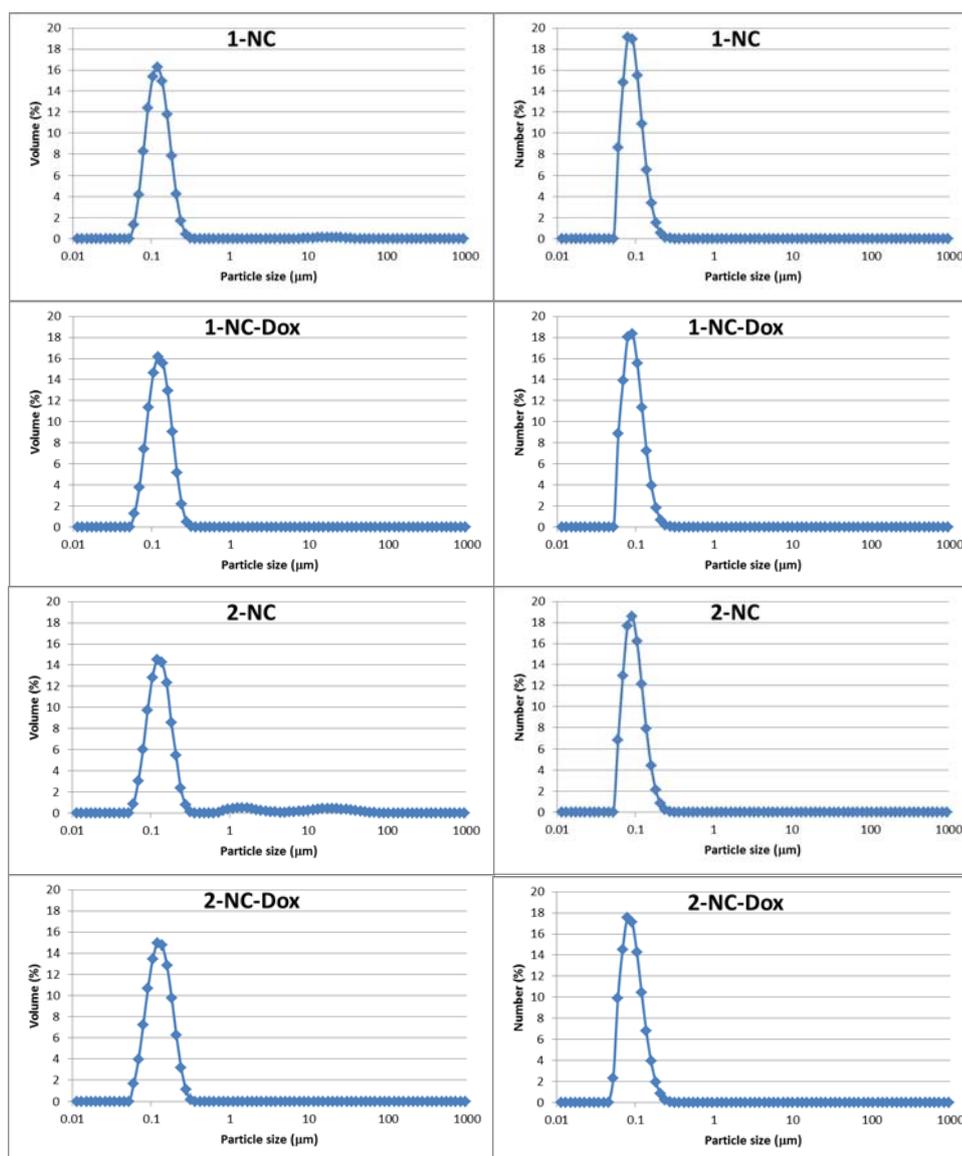


Figura 51. Difração a laser das formulações submetidas à avaliação biológica, em volume (esquerda) e número (direita).

As formulações apresentaram valor de Span variando de 0.9 a 1.6, indicando uma estreita distribuição de tamanhos de partícula (Tabela 10). Ainda, todas as

formulações tiveram diâmetros médios, baseados no número de partículas ($d_{0.5_n}$), inferior a 100 nm (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de difração de laser das formulações de nanocápsulas brancas e contendo doxorrubicina ($n = 3$, média \pm DP).

Formulação	$D[4.3]_v$ μm	$d_{0.5_v}$ μm	SPAN	$d_{0.5_n}$ μm	Área Superficial Específica (m^2/g)	pH
1-NC	0.600 \pm 0.50	0.120 \pm 0.01	1.078 \pm 0.26	0.085 \pm 0.00	51.400 \pm 3.64	7.5 \pm 0.19
1-NC-Dox	0.466 \pm 0.33	0.119 \pm 0.01	1.116 \pm 0.38	0.082 \pm 0.00	52.200 \pm 3.06	7.2 \pm 0.17
2-NC	0.791 \pm 0.54	0.134 \pm 0.02	1.680 \pm 0.96	0.079 \pm 0.01	48.167 \pm 4.31	7.2 \pm 0.24
2-NC-Dox	0.668 \pm 0.51	0.120 \pm 0.00	0.987 \pm 0.08	0.085 \pm 0.00	51.633 \pm 2.10	7.2 \pm 0.18

A seguir, temos os resultados de DLS para as formulações preparadas a partir dos copolímeros ARGET-A e ARGET-B quando diluídas em diferentes meios: água, tampão fosfato de potássio pH 7,4 e pH 5,5. Esses resultados mostram que as quatro formulações respondem ao pH 5,5, devido a presença de DMAEMA nos copolímeros. A exposição da formulação ao pH ácido leva a protonação da amina, que por repulsão eletrostática a partir das cargas positivas permite a expansão da porção acrílica, confirmando sua sensibilidade ao pH (GUO, 2010; MIGUEL, 2008). A média de diâmetro de 1-NC e 1-NC-Dox foi 70 e 95 nm, enquanto a 2-NC e 2-NC-Dox foi de 60 e 57 nm, respectivamente (Tabela 11). Pode-se observar que as formulações com o copolímero ARGET-B (2-NC e 2-NC-Dox, preparada com o dobro de concentração de fármaco que a formulação 1-NC-Dox) apresentaram diâmetros relativamente próximos a inferiores em relação às formulações com o copolímero ARGET-A (1-NC e 1-NC-Dox). É possível que a concentração do fármaco não influencie (até certo limite de concentração) o diâmetro do núcleo da nanocápsula uma vez que se utiliza a mesma concentração de óleo na preparação das formulações com ambos copolímeros.

Tabela 11. Análise por DLS para o comportamento de nanocápsulas em diferentes ambientes (n=3).

Formulações	Diâmetro médio (Z-average diameter, nm)	PDI	Coefficiente de difusão (μ^2/s)
1-NC em água	69.81±3.69	0.226±0.01	3.53±0.20
1-NC em pH 7.4	73.49±5.08	0.237±0.02	3.36±0.21
1-NC em pH 5.5	96.23±16.08	0.259±0.063	2.60±0.35
1-NC-Dox em água	94.90±2.67	0.382±0.07	2.94±0.54
1-NC-Dox em pH 7.4	90.38±3.93	0.294±0.02	2.72±0.11
1-NC-Dox em pH 5.5	150.93±23,27	0.357±0.14	1.66±0.27
2-NC em água	60.57±0.85	0.190±0.01	4.06±0,05
2-NC em pH 7.4	71.51±3.07	0.226±0.03	3.44±0.14
2-NC em pH 5.5	100.93±10.37	0.295±0.05	2.45±0.24
2-NC-Dox em água	57.01±0.49	0.139±0.02	4.31±0.04
2-NC-Dox em pH 7.4	75.03±1.65	0.252±0.02	3.28±0.07
2-NC-Dox em pH 5.5	104.9±2.85	0.354±0.00	2.35±0.06

Outro aspecto importante a ser observado é a variação do coeficiente de difusão nos diferentes ambientes. As nanopartículas demonstraram que o coeficiente de difusão diminui em meio ácido em comparação ao neutro ou básico.

Somente as partículas preparadas a partir do copolímero ARGET-A demonstraram PDI > 0.1 ao serem diluídas em água. O PDI representa a largura da distribuição e uma vez maior que 0.1, a qualidade do resultado se encontra prejudicada (BOGAERT, 1992), então os diâmetros por CONTIN são mostrados na Tabela 12 para auxiliar na análise deste resultado.

Tabela 12. Parâmetros de DLS (CONTIN) obtidos a partir das formulações de nanocápsulas (n =3).

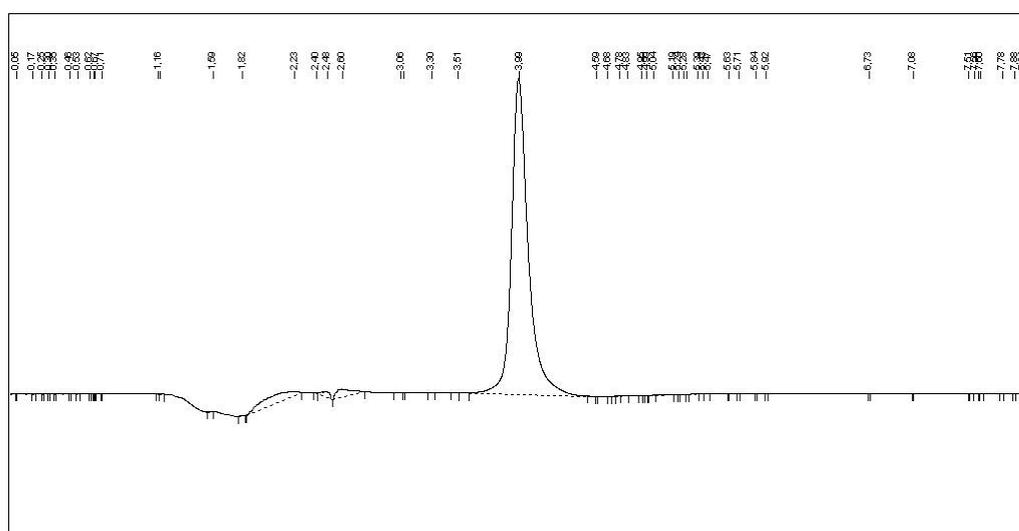
Formulations	d_i (nm)	d_v (nm)	d_n (nm)
1-NC	77.08±7.52	65.81±6.18	75.69±12.49
1-NC-Dox	129.00±6.39	100.03±8.64	200.07±17.27
2-NC	67.87±0.53	54.37±0.67	71.62±3.09
2-NC-Dox	63.93±0.97	52.26±0.59	74.24±0.39

Conforme se pode observar, os diâmetros por CONTIN, em intensidade e número, apresentam valores mais aproximados, exceto pela 1-NC-Dox, que atinge 200 nm, apresentando uma formulação mais heterogênea.

11.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DOXORRUBICINA POR CLAE

O método por CLAE desenvolvido foi adaptado do estudo de Missirlis (2006), com modificações em relação às proporções dos solventes da fase móvel, utilizando o procedimento para as nanopartículas de PCL-b-P(MMA-DMAEMA)₂.

Os resultados da curva de calibração, contendo o perfil cromatográfico apresentam-se a seguir (Figura 52).



Para o estudo da linearidade foram preparadas três curvas de calibração, analisadas em três dias diferentes e com leituras em triplicata de cinco concentrações de doxorrubicina em cada curva (Tabela 13).

Tabela 13: Médias das áreas obtidas com diferentes concentrações de solução de cloridrato de doxorrubicina nas três curvas de calibração por CLAE, 254 nm.

Concentração (µg/mL)	Curva A	Curva B	Curva C	Média	DPR (%)
0.5	9356.7	10072.6	9718.0	9715.7	3.68
1	21865.2	23117.6	21219.7	22067.5	4.37
5	510165.0	523415.4	529020.3	520866.9	1.86
10	1056200.9	1060029.0	1149609.2	1088613.0	4.86
15	1618762.0	1540632.0	1613240.5	1590878.1	2.74

Os valores da curva de calibração têm DPR < 5% conforme preconizado pela ANVISA (2003). A equação da reta obtida apresentou um coeficiente de regressão linear de 0,9984 e o valor de Fcalculado ($F_{\text{calc.}} = 1820.65$) foi significativo em relação ao valor de Fcrítico ($F_{\text{crit.}} = 0.0000283$), demonstrando que a linearidade é satisfatória (Figura 53).

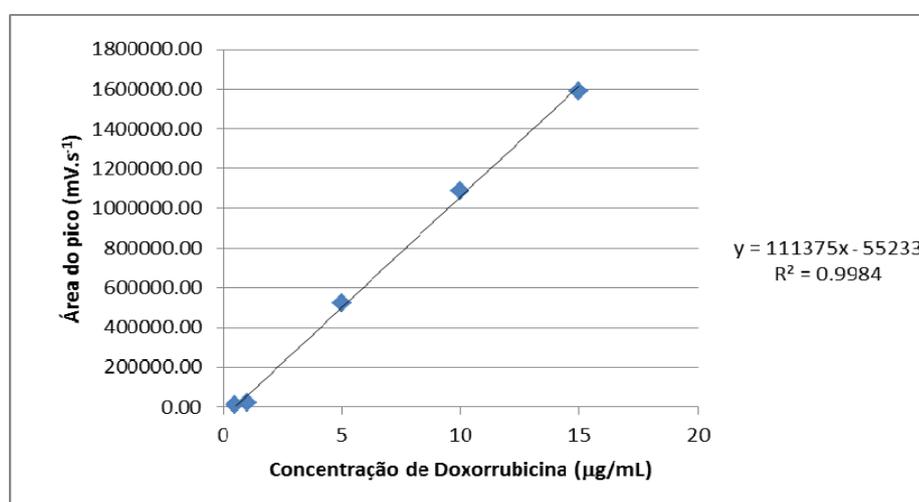


Figura 53. Curva de calibração para o cloridrato de doxorrubicina por CLAE, 254 nm.

A análise estatística dos dados da curva de calibração por ANOVA (fator único) e regressão linear simples, foi avaliada conforme abaixo (Tabela 14).

Tabela 14. Parâmetros da análise de regressão para dados da curva de calibração da doxorubicina por CLAE, 254 nm.

Parâmetros	Coeficientes	Erro Padrão	LI	LS	Valor-p
Inclinação (a)	111374.8	2610.2	103068	119681.6	0.085825
Intersecção (b)	-55233.02	21877.4	-124857	14390.8	0.0000283

LI = limite de confiança inferior; LS = limite de confiança superior, nível de significância de 5%.

Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação foram 0,227 e 0,758 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade do método para a determinação da doxorubicina.

A seguir, apresenta-se o cromatograma da avaliação da especificidade do método na detecção de doxorubicina sem a interferência de excipientes das formulações de nanopartículas na Figura 54.

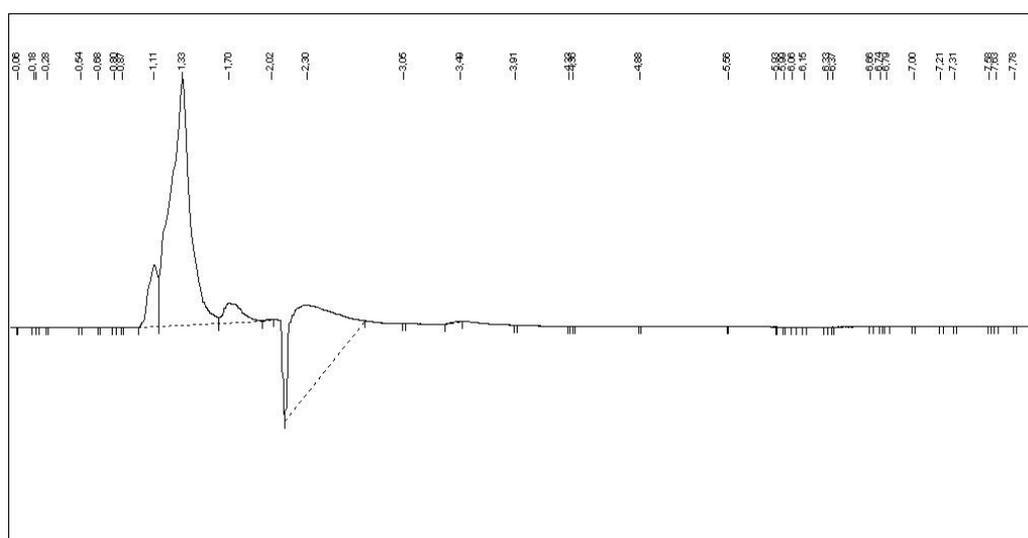


Figura 54. Cromatograma do teste de especificidade em nanocápsulas brancas de PCL-b-P(MMA-DMAEMA)₂, a partir dos copolímeros ARGET-A ou ARGET-B.

Pode-se observar que no tempo de retenção da doxorubicina (3.99 minutos), não há nenhuma alteração significativa na linha de base no intervalo de 3,5 a 5,0 minutos, demonstrando que os componentes da nanopartícula não afetam a detecção e quantificação da doxorubicina.

Da mesma forma, foi avaliada a exatidão do método, a partir de volumes fixos de suspensões de nanopartículas (1-NC-Dox e 2-NC-Dox), contaminadas com volumes variáveis de uma solução de cloridrato de doxorubicina a 5 µg/mL (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados do teste de exatidão para doseamento de doxorubicina a partir de nanocápsulas poliméricas por CLAE, 254 nm (n = 3, média).

Amostras	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)
1-NC-Dox_{5µg/mL}:			
S1	0.75	0.74	98.29
S2	1.0	1.01	100.80
S3	1.25	1.26	100.90
2-NC-Dox_{10µg/mL}:			
S1	1.5	1.52	101.88
S2	2.0	2.02	101.22
S3	2.5	2.54	101.76

As recuperações obtidas a partir das duas nanopartículas situaram-se entre 98-102%, demonstrando que o doseamento da doxorubicina contida em nanocápsulas é exato.

A precisão intermediária foi determinada por medidas do ponto médio da curva em três dias diferentes, estando os resultados apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados da precisão intermediária ou inter-dia da doxorubicina por CLAE, 254 nm.

Dia	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	Média de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%) do dia
1	5.09	101.84	5.08	0.18
	5.08	101.52		
	5.08	101.61		
2	5.13	102.64	5.17	0.75
	5.19	103.84		
	5.19	103.90		
3	5.17	103.45	5.25	1.34
	5.28	105.59		
	5.29	105.71		

Observam-se valores de teor entre 101 e 106%, com DPR < 5%, conforme preconizado pela ANVISA (2003), logo, o método se mostra preciso quando avalia uma mesma concentração em diferentes dias.

Também foi avaliada a repetibilidade de uma amostra de concentração 5 $\mu\text{g/mL}$, submetida a 6 leituras em um mesmo dia (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados da repetibilidade de solução de doxorubicina a 5 $\mu\text{g/mL}$, por CLAE, 254 nm.

Repetições	Recuperação (%)	DPR (%)
R1	101.84	0.45
R2	101.52	
R3	101.61	
R4	100.97	
R5	102.10	
R6	101.15	

Neste teste, obtiveram-se recuperações entre 100 e 103%, com DPR <5% (ANVISA, 2003), confirmando a precisão do método ao analisar-se uma amostra repetidamente em um mesmo dia.

Portanto, o método CLAE desenvolvido mostrou-se linear, específico, sensível, exato e preciso na faixa de 0,5 a 15 µg/mL, sendo adequado para a quantificação de doxorubicina a partir de nanocápsulas poliméricas.

11.4 DETERMINAÇÃO DE CARGA DE SUPERFÍCIE DAS NANOCÁPSULAS E DA ENCAPSULAÇÃO DA DOXORRUBICINA

As nanocápsulas preparadas a partir dos copolímeros ARGET-A (1-NC e 1-NC-Dox) e ARGET-B (2-NC e 2-NC-Dox) apresentaram potencial zeta positivo, conforme apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Quantificação da doxorubicina em nanopartículas por CLAE e análise de DLS (n=3).

Amostra	Conteúdo de fármaco (DC, mg/mL)	Carreamento de fármaco (DL, mg/g%)	Eficiência de encapsulação (EE, %)	Diâmetro médio (Z-average, nm, H ₂ O)	PDI	Potencial zeta (mV)
1-NC	0	0	0	69.81 ±3.69	0.226 ±0.01	+23.47 ±5.46
1-NC-Dox	0.008±0.00	0.04 ±0.0001	61.42 ±0.23	94.90 ±2.67	0.382 ±0.07	+22.28 ±4.70
2-NC	0	0	0	60.57 ±0.85	0.190 ±0.01	+13.26 ±0.86
2-NC-Dox	0.014 ±0.00	0.07 ±0.0016	64.88 ±1.36	57.01 ±0.49	0.139 ±0.02	+7,48 ±0,79

DC = drug content, DL = drug loading, EE = encapsulation efficiency.

Por meio da quantificação por CLAE, as nanocápsulas apresentaram uma boa eficiência de encapsulação (60-65% de doxorubicina), diâmetros médios inferiores a 100 nm e potencial zeta positivos.

11.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS NANOCÁPSULAS DE PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Os resultados das formulações 1-NC e 1-NC-Dox testadas em células MCF-7 estão expostos na Figura 55.

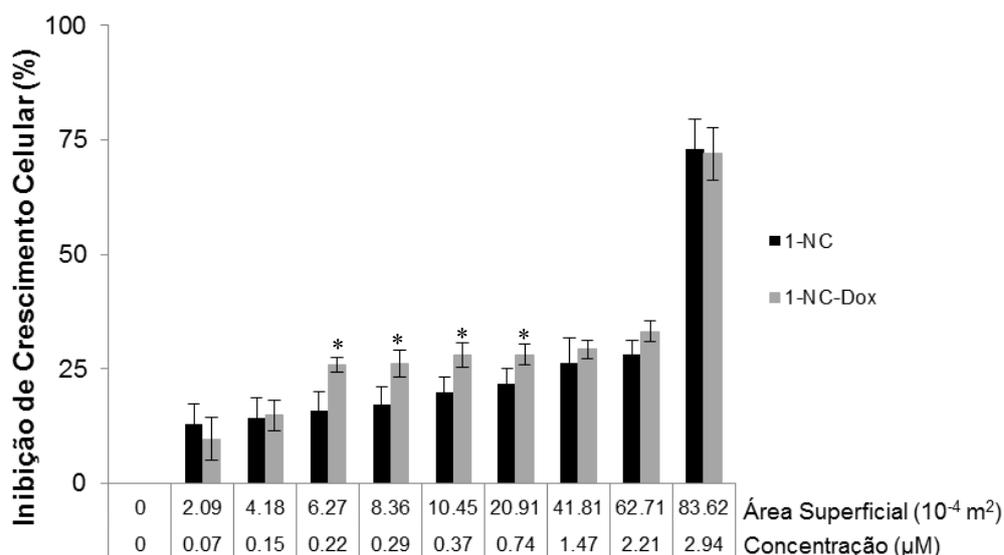


Figura 55. Citotoxicidade das formulações 1-NC and 1-NC-Dox por área superficial (ASS) e equivalência por concentração (μM) de doxorrubicina para a 1-NC-Dox, por ensaio de MTT ($n=3$, triplicata).

Por meio da análise de variância (ANOVA, *two way with repetition*) da inibição de crescimento celular por área específica superficial, obtivemos o valor de $F_{\text{calculado}} = 2,35$, $F_{\text{crítico}} = 2,12$, $p=0,031$ e $GL = 9$ entre interações, que demonstram haver diferenças estatísticas em nível de confiança de 95% entre as amostras testadas (meio de cultura e formulações). A seguir, efetuou-se o teste Tukey (HSD (diferença significativa) = 7,26), o qual demonstrou diferenças estatísticas entre o controle (meio de cultura) e todas as áreas específicas superficiais (ASS) de ambas as formulações.

A formulação 1-NC é citotóxica a partir de $41,81 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ de área superficial pois apresentou inibição de crescimento celular (>25%) de 26,4% enquanto a 1-NC-Dox em $6,27 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ apresentou inibição de 25,8%.

Ao compararmos a 1-NC com 1-NC-Dox, somente houve diferença significativa entre as ASS de $6,27$ a $20,91 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ (representadas por *), que ocorreu devido ao efeito da doxorrubicina na nanocápsula.

Considerando os resultados obtidos com nanocápsulas do copolímero ARGET-A, procedeu-se a investigação dos excipientes das nanocápsulas cujos resultados na Figura 56.

Na Figura 56–A foram avaliados os excipientes utilizados nas nanocápsulas, diluídos em água (PCL foi utilizada na forma de nanoesfera), cujo controle foi o meio de cultura DMEM. Segundo a ANOVA (*two way with repetition*) os valores de F calculado foi 8,99 e $F_{\text{crítico}} = 2,06$, $p = 2,01 \cdot 10^{-7}$ para $GL = 11$ entre grupos, logo, estatisticamente significativos. Pelo teste Tukey, obteve-se um valor de HSD = 11,35, demonstrando a existência de diferenças significativas entre o controle e todas as concentrações de nanoesferas de PCL e de PDMAEMA testadas (representadas por *). Entretanto, somente a amostra de PDMAEMA a 0,677 mM (2%) reduziu a viabilidade celular abaixo de 75% (62,43% de viabilidade celular), sendo considerado um material de pequena citotoxicidade se pensarmos que as nanocápsulas 1-NC e 1-NC-Dox foram preparadas com 3,4 e 3,3 mg/mL de copolímero ARGET-A (que contém DMAEMA em sua composição) e 0,677 mM de PDMAEMA corresponderia a 0,06 mg/mL.

Já o polissorbato 80 (Tween 80) e as nanoesferas de PCL não demonstraram redução na viabilidade celular abaixo de 75%, não sendo considerados citotóxicos (Figura 56).

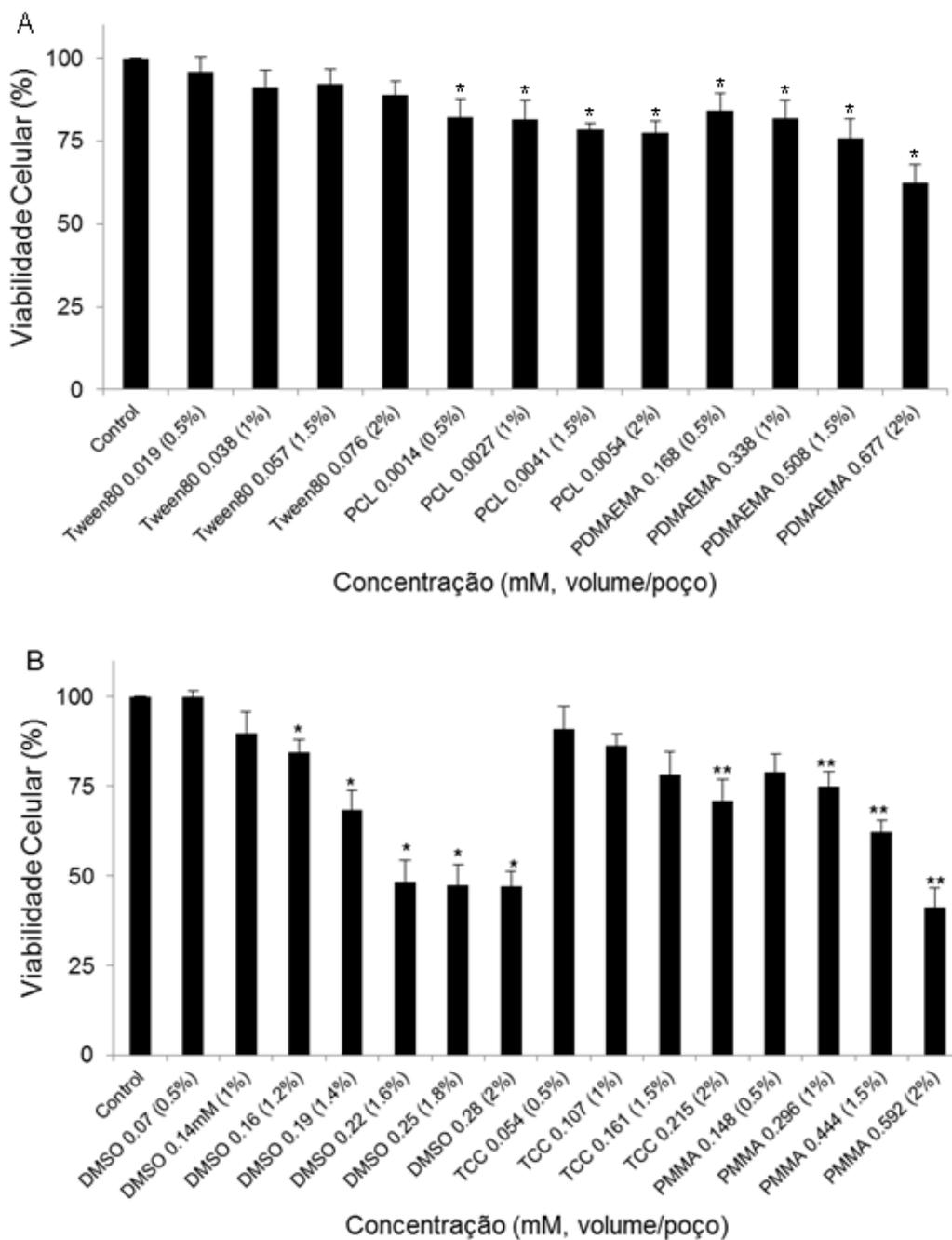


Figura 56. Citotoxicidade dos excipientes das nanocápsulas por ensaio de MTT: (A) compostos cujo controle foi o meio de cultura e (B) compostos cujo controle foi o DMSO a 1% (n = 1, quadruplicata).

Na Figura 56-B observam-se os resultados de citotoxicidade dos excipientes das nanocápsulas de carácter lipofílico: óleo (ou TCC) e PMMA preparados em diluição em 1 mL DMSO. Sendo assim, o DMSO também foi testado a fim de determinar seu limite de uso. Uma vez que os componentes lipofílicos foram solubilizados em 1 mL de DMSO, o controle foi considerado sendo o DMSO a 1% (89,94% de viabilidade celular).

A análise estatística por ANOVA (*two way with repetition*) demonstraram valor F calculado = 25,47, F crítico = 1,96 e $p = 9,09 \cdot 10^{-16}$ com GL = 13 entre grupos, demonstrando a existência de diferenças estatísticas entre as amostras (controle e excipientes testados, representado por *). Por teste Tukey obteve-se HSD = 12,75, onde as diferenças estatísticas encontram-se entre o controle (meio de cultura DMEM) e as concentrações de DMSO de 0,16 mM a 0,28 mM (*). Entretanto, somente a partir de 0,19 mM de DMSO (1,4%) é que a viabilidade celular decai abaixo de 75%, sendo citotóxico (68,43%).

Considerando a comparação entre o DMSO a 1% e as amostras (representado por **), o TCC a 0,215 mM (redução da viabilidade celular para 70,90%) demonstra diferença significativa. É importante ressaltar que o óleo (TCC) foi utilizado nas formulações 1-NC e 1-NC-Dox a 5,74 mg/mL e 4,91 mg/mL, respectivamente. Enquanto a concentração de 0,215 mM aplicada no estudo de citotoxicidade corresponde a 0,1 mg/mL. Sendo assim, considerou-se o óleo (TCC) de pequena citotoxicidade. Houve diferença significativa também entre o DMSO a 1% e o PMMA a partir de 0,296 mM (74,97% de viabilidade celular). Se avaliarmos sua equivalência em relação ao preparo das nanocápsulas, 1-NC e 1-NC-Dox, preparadas com 3,4 e 3,3 mg/mL de copolímero ARGET-A (que contém MMA em sua composição), a concentração de 0,296 mM de PMMA corresponderia a 0,03 mg/mL. Sendo assim, o PMMA foi considerado o material mais citotóxico, dentre os componentes da formulação, para as células MCF-7.

Assim, confirma-se a hipótese de que as nanocápsulas preparadas a partir do copolímero ARGET-A (1-NC e 1-NC-Dox) apresentaram citotoxicidade inerente ao material do qual foram produzidas. Com isso, a síntese do copolímero ARGET-A foi otimizada (com redução de MMA), fornecendo o copolímero ARGET-B e, a partir deste, as nanocápsulas 2-NC e 2-NC-Dox foram avaliadas sobre células MCF-7 por teste MTT, 24 horas (Figura 57).

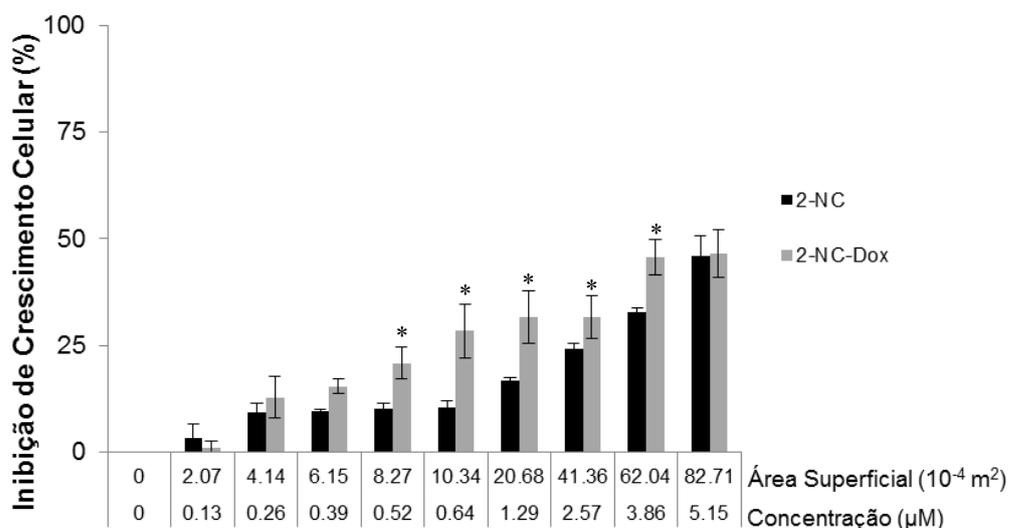


Figura 57. Citotoxicidade das formulações **2-NC** e **2-NC-Dox** por área superficial (ASS) e equivalência por concentração de doxorrubicina (μM) para a **2-NC-Dox**, por ensaio de MTT ($n=3$, triplicata).

Os dados da Figura 58 foram avaliados por ANOVA (*two way with repetition*) obtendo o valor de $F_{\text{calculado}} = 4,99$, $F_{\text{crítico}} = 2,12$ e $p = 0,0002$ com $GL = 9$ para interações. As diferenças significativas são apontadas por teste Tukey ($HSD = 7,42$) entre o controle (meio de cultura) e as formulações **2-NC** e **2-NC-Dox**. Para **2-NC** as diferenças ocorrem de $8,27$ a $82,71 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ e para **2-NC-Dox** de $4,14$ a $82,71 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. A **2-NC** na área específica superficial de $62,04 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ apresentou inibição de crescimento celular de $32,8\%$ enquanto que a **2-NC-Dox** em $10,34 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ foi de $28,4\%$.

Ao compararmos a **2-NC** com **2-NC-Dox**, as diferenças significativas ocorrem nas ASS de $8,27$, $10,34$, $20,68$, $41,36$ e $62,04 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ (como indicado pelo *).

Observa-se que com a otimização do copolímero, a **2-NC-Dox** foi mais citotóxica que a **2-NC**, demonstrando o efeito do fármaco encapsulado ($14 \mu\text{g/mL}$), sem a citotoxicidade apresentada pelo copolímero.

A seguir, apresentam-se os resultados das nanocápsulas contendo doxorrubicina em comparação à solução do cloridrato de doxorrubicina (Figura 58).

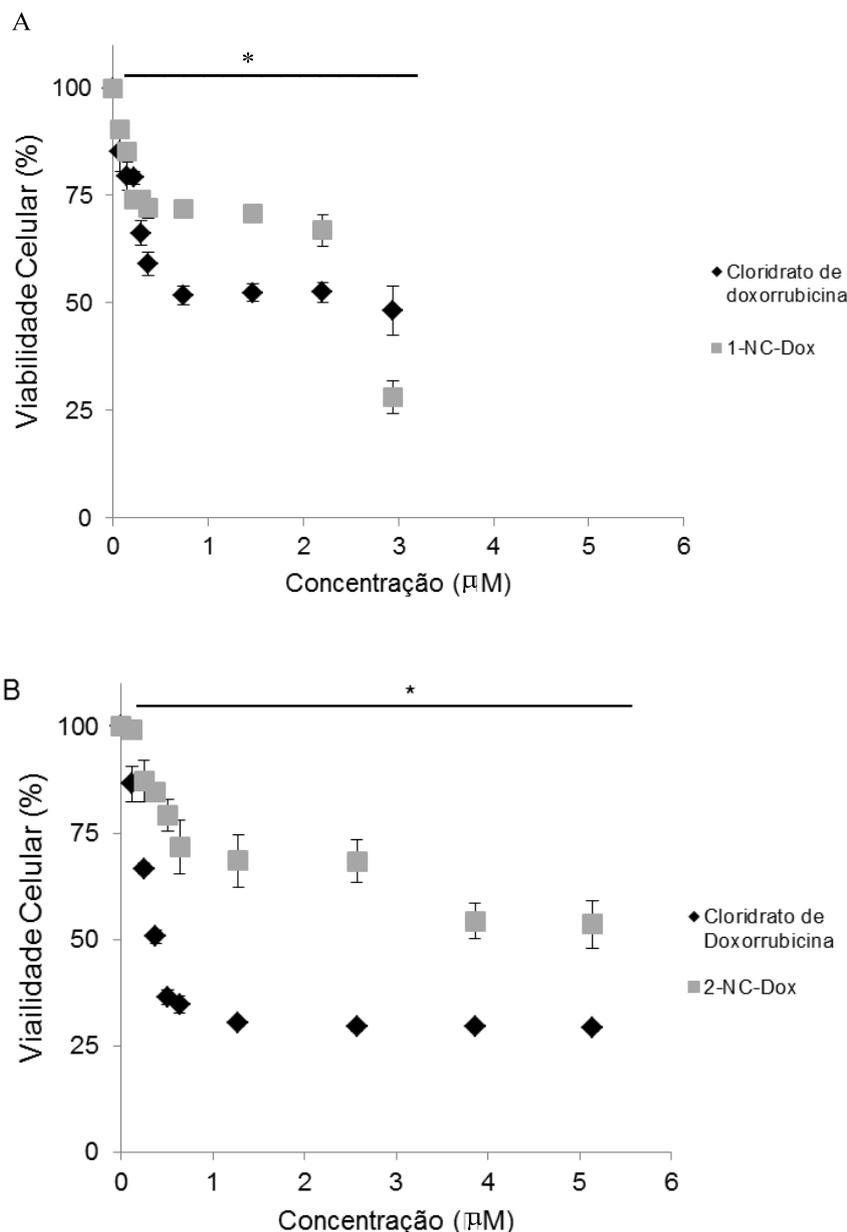


Figura 58. Citotoxicidade das formulações 1-NC-Dox (A) e 2-NC-Dox (B) por concentração de doxorubicina (μM) em comparação à solução de cloridrato de doxorubicina, por ensaio de MTT ($n=3$, triplicata).

Segundo a ANOVA (*two way with repetition*) para os resultados da Fig. 70-A, por concentração de doxorubicina, temos F calculado = 69,95, Fcrítico = 2,12 e $p = 1,21 \cdot 10^{-21}$, demonstrando a existência de diferenças estatísticas significativas. Por Tukey, HSD = 5,38, onde as soluções do cloridrato de doxorubicina foram estatisticamente diferentes do controle a partir de 0,15 μM até 2,94 μM , enquanto que a 1-NC-Dox foi diferente de 0,07 a 2,94 μM (essas diferenças não foram identificadas na Figura 59-A). A solução do cloridrato de doxorubicina e a 1-NC-Dox

foram citotóxicas a partir de 0,22 μM (reduziram a viabilidade celular para 70,97% e 74,17%, respectivamente). Considerando a comparação da solução de cloridrato de doxorubicina com a 1-NC-Dox as diferenças significativas (entre amostras, representadas por *) encontraram-se em 0,07 μM e de 0,29 a 2,21 μM .

Já na Figura 59-B, temos a comparação de 2-NC-Dox a soluções de cloridrato de doxorubicina, onde por ANOVA (*two way with repetition*), obtivemos F calculado = 20,56, F crítico = 2,12 e $p = 2,29 \cdot 10^{-12}$. Tukey apresenta HSD = 7,24, onde observamos que as diferenças estatísticas encontram-se entre o controle e a solução de cloridrato de doxorubicina a partir de 0,25 μM e entre o controle e a 2-NC-Dox a partir de 0,12 μM (diferenças não identificadas na Fig. 69-B). A solução de doxorubicina torna-se citotóxica a partir de 0,25 μM , com uma redução na viabilidade celular para 66,67%, enquanto que a 2-NC-Dox em 0,63 μM reduz a viabilidade para 71,59%.

Ao compararmos o tratamento das células entre a solução de cloridrato de doxorubicina e com a formulação 2-NC-Dox, observamos as diferenças significativas (representadas por *) nas concentrações de 0,07 a 2,94 μM , ou seja, em todos os pontos de concentração, sendo a solução do cloridrato de doxorubicina mais citotóxica do que a formulação em 24 horas de experimento.

Dentre as formulações, a 2-NC-Dox apresentou maior citotoxicidade (embora inferior a da solução do cloridrato de doxorubicina) em 24 horas por ensaio de MTT. Não foi possível realizar análise estatística da comparação de ambas as formulações em relação a solução do fármaco livre devido a serem preparadas a partir de copolímeros diferentes.

Foi possível obter nanopartículas de PCL-*b*-P(MMA-DMAEMA)₂ pH-responsivas capazes de encapsular em torno de 60-65% de doxorubicina, sendo promissores carreadores para veiculação de antineoplásicos às células de câncer de mama e que ainda possibilitam a observação de efeito citotóxico sobre células MCF-7, além de possibilitar o futuro emprego de um ligante como o LDV para a vetorização à integrinas específicas.

12. DISCUSSÕES DO CAPÍTULO 2

Os resultados obtidos a partir de formulações contendo o copolímero produzido por ATRP e denominado MLT20 permitiram algumas observações:

- misturas de PCL:MLT20 são viáveis a serem utilizadas no preparo de nanocápsulas (necessitando ajustes).
- o emprego de tampão fosfato de potássio pH 7,4 é inadequado para a formação de nanocápsulas, pois altera a força iônica da formulação, tornando-a totalmente micrométrica.

A força iônica é considerada a medida de intensidade do campo elétrico em uma solução sendo expressa por: $\mu = \frac{1}{2} \sum (c_i \times (z_i)^2)$, onde: μ = força iônica, Σ = somatório, c_i = concentração molar do tampão e, z_i = valência do íon i . Sendo assim, os tampões em questão possuem z_i igual a zero, logo não foi possível calcular o valor da força iônica para os mesmos. De alguma forma, a solução tampão empregada nas suspensões de nanopartículas pode ter interagido com a acetona da fase orgânica e gerado a formação de aglomerados por efeito de blindagem eletrostática. Cayre et al (2011) cita que polímeros pH-responsivos geralmente são também responsivos a mudanças de força iônica e, alguns podem ser seletivos quanto a responsividade dependendo do íon específico presente no meio.

- em relação a formulações preparadas em tampão fosfato de potássio pH 5,5, o principal fator que influenciou o aparecimento da porção micrométrica não foram as concentrações de polímero, óleo ou tensoativo (embora se deva manter uma relação próxima a ideal entre os componentes, que seria, segundo Jornada (2012) para nanopartículas de PCL, de 1:0,4:1,6:0,77 para polímero:Span 60:TCC:Tween 80 e sim, o fato de ter sido empregado o copolímero MLT20 como o único componente polimérico da fase orgânica, uma vez que é um bloco grande de unidades monoméricas.

- a melhor formulação para o copolímero MLT20 foi a NC3, preparada em água, a qual respondeu conforme almejado às modificações de diâmetro frente ao pH 5,5 além de empregar uma baixa concentração de polímero na formulação. O incremento no diâmetro quando diluída em pH 5,5 comprova a protonação da amina

do DMAEMA e o alongamento da cadeia, o qual possivelmente ocorre em regiões de inflamação e câncer onde o pH é geralmente ácido (meio extracelular tumoral com pH = 6,5 e meio intracelular tumoral com pH = 4,0-6,0).

- a retirada do Span 60[®] da formulação (NC3F2) evita a ocorrência de interação deste com o DMAEMA, embora tenha prejudicado o perfil de distribuição de diâmetros de partícula. Não foram encontrados relatos na literatura do tipo de interação especificamente, apesar de haver uma citação que relata a retirada total de tensoativos e estabilizantes da formulação, uma vez que o copolímero citado (PMMA-*b*-PDMAEMA) age como estabilizador e floculante (PENOTT-CHANG, 2012).

Em relação ao copolímero ARGET-A e as nanocápsulas preparadas a partir deste no estudo de pré-formulação, observou-se que a NC17 apresentou o melhor perfil de distribuição de tamanhos de partícula por difração a laser (majoritariamente nanométrica) e, também se expandiu quando exposta ao pH ácido, de forma mais discreta que a NC3, devido ao menor número de unidades monoméricas no bloco.

Sagar e colaboradores (2007) citam que copolímeros em blocos possuem segmentos solúveis e insolúveis ligados covalentemente entre si e, o segmento solúvel forma uma coroa enquanto o segmento insolúvel agrega em um núcleo micelar denso como observado para diblocos, confirmando a observação de agregados insolúveis presentes durante o preparo das suspensões. Segundo o perfil de distribuição de tamanho de partículas obtido por difração a laser, pode-se concluir que se obtiveram nanocápsulas e, paralelamente houve formação de agregados micrométricos, em função da solubilidade distinta dos monômeros presentes no bloco.

Ainda, as nanopartículas preparadas a partir do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ (MLT20 (NC3) ou ARGET-A (NC17)) apresentaram potencial zeta positivo devido a protonação da amina do DMAEMA em meio aquoso. Considerou-se a NC17 sendo a melhor formulação de nanocápsulas do estudo de pré-formulação para dar continuidade ao estudo.

Na literatura, até o momento, encontram-se relatos de nanopartículas com PCL-PMMA (BARANDIARAN, 2014); PCL-PDMAEMA (GUO, 2010), PMMA-PDMAEMA (CAYRE, 2012; FENG, 2009) e, PCL em blenda com PMMA-*b*-PDMAEMA (PENOTT-CHANG, 2012). Considerando estes trabalhos, o copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ e sua aplicação em nanocápsulas é inédito e garante que a

ligação química entre os monômeros permaneça estável em pH ácido ao mesmo tempo que permite a expansão de diâmetros das nanocápsulas nesta condição.

A seguir, determinou-se o IC_{50} da solução de cloridrato de doxorubicina por ensaio MTT obtendo o valor de $4,77 \pm 0,05 \mu\text{M}$ frente às células MCF-7. Este resultado está de acordo com Tassone et al (2003) que relatam que o IC_{50} da doxorubicina em MCF-7 se encontra situado entre 1 e $5 \mu\text{M}$ por MTT, após 48 horas.

Sendo assim, partindo da formulação NC17, foram preparadas formulações a partir do copolímero ARGET-A denominadas **1-NC** (branca) e **1-NC-Dox** e formulações a partir do copolímero ARGET-B denominadas **2-NC** (branca) e **2-NC-Dox**.

O método CLAE adaptado de Missirlis (2006) foi utilizado para a quantificação da doxorubicina a partir de nanocápsulas. O método se mostrou eficiente e rápido de execução. Podemos observar que **1-NC-Dox** foi preparada com doxorubicina a $5 \mu\text{g/mL}$ e a quantificação do fármaco na nanopartícula foi $8 \mu\text{g/mL}$, apresentando eficiência de encapsulação de 61,42%. A **2-NC-Dox** foi preparada a $10 \mu\text{g/mL}$ e quantificada a $14 \mu\text{g/mL}$, tendo eficiência de encapsulação de 64,88%. Essas diferenças na dosagem de doxorubicina se devem pelo fato de ter sido empregada uma seringa de vidro para a veiculação do fármaco durante o preparo da nanocápsula, logo, vemos que há um pequeno erro no volume administrado e, conseqüentemente, na dosagem. Não foi utilizada pipeta automática, pois o menor volume disponível era de $5 \mu\text{L}$.

As formulações estudadas demonstraram boa eficiência de encapsulação da doxorubicina em comparação a outros carreadores como micelas de PCL-MPEG (monometoxi poli(etilenoglicol)) que foram capazes de encapsular somente 4% de doxorubicina, nanopartículas de P(MMA-g-EG), ou seja, poli-ácido metacrílico-g-etilenoglicol, com eficiência de encapsulação de 64% e, nanopartículas de PLGA (poli-(ácido láctico-co-glicolítico) com 55% de eficiência de encapsulação (SCHOENER, 2012; JAIN, 2011; SHUAI, 2004).

As quatro formulações (**1-NC**, **1-NC-Dox**, **2-NC** e **2-NC-Dox**) demonstraram diâmetros médios de 69, 94, 60 e 57 nm, respectivamente e, potencial zeta positivo, confirmando o caráter catiônico proveniente da presença de DMAEMA.

A carga superficial catiônica de nanopartículas de acrilatos leva a uma maior eficiência de encapsulação (HOFFMAN, 1997). Esta é dependente da presença de PCL amorfa, pois a desprotonação de grupos hidroxilas ou amino da doxorubicina causa interação por pontes de hidrogênio com o grupo carbonila da PCL amorfa e, também, a presença de interações hidrofóbicas pode guiar o processo de encapsulação (VERDUN, 1990).

Quanto ao diâmetro médio das formulações, podem-se destacar duas observações principais:

1) As quatro formulações apresentaram diâmetros ≤ 100 nm.

Nanocápsulas com diâmetros inferiores a 100 nm são capazes de se difundir e acessar as células tumorais mais facilmente e, ainda manterem-se mais estáveis frente ao pH ácido do local em comparação com as nanopartículas preparadas a partir de blendas de PCL/PMMA-b-PDMAEMA com diâmetros de 100 a 180 nm, conforme produzidas por Penott-Chang (2012). Ainda, carreadores com diâmetros superiores a 200 nm são passíveis de serem capturados pelo sistema retículo endotelial (200-700 nm) (LI, 2010). Estas nanocápsulas comprovaram ser pH-responsivas, expandindo-se em pH 5,5 para diâmetros em torno de 100 a 150 nm e, ainda, demonstraram a redução no coeficiente de difusão quando em meio ácido. Essa observação indica que as nanocápsulas, uma vez circulantes na corrente sanguínea, provavelmente difundiriam ao encontrar rupturas do endotélio e, tenderiam a se deslocar para o sítio tumoral, tendo ação por EPR (LI, 2010). Nessa condição, entumesceriam dissolvendo o fármaco e liberando seu conteúdo às células tumorais, o que poderá ser comprovado com futuros estudos *in vivo* (GOU, 2009; LEE, 2005).

2) Os diâmetros por CONTIN avaliam a heterogeneidade dos diâmetros das formulações, uma vez que este é utilizado para amostras heterogêneas com distribuição de tamanho de partículas ampla que desvia significativamente do log normal. Logo, o CONTIN é uma aproximação de um modelo livre para interconverter diferentes médias (BOGAERT, 1992). Miguel et al (2008) avaliaram a distribuição populacional de micelas de PDMAEMA por análise de CONTIN e mencionaram que as distribuições bimodais tem sido obtidas para micelas poliméricas preparadas a partir do copolímeros em blocos anfifílicos. Também, o tamanho das micelas tipo núcleo-parede podem variar dezenas de nanômetros, obtendo tamanhos largos, ou seja, maiores que 100 nm, o que reflete em agregações intermoleculares, como

associações entre micelas ou interações hidrofóbicas. Das formulações desenvolvidas no nosso estudo, somente 1-NC-Dox apresentou diâmetros maiores que 100 nm por CONTIN, o qual provavelmente se deva a interações hidrofóbicas entre os componentes da formulação.

Uma vez caracterizadas as nanocápsulas e comprovada sua expansão de diâmetro frente a pH ácido, realizou-se o ensaio citotoxicidade por MTT das formulações e seus excipientes frente as células MCF-7 por período de 24 horas.

Segundo Csaba (2005), não há efeitos tóxicos para a viabilidade celular acima de 70 a 80% e, segundo o critério Weisenthal é considerado que uma redução de viabilidade celular acima de 30% representa a sensibilidade ao fármaco (WILSON, 1990). Com base nessas literaturas, foi estabelecido que valores abaixo de 75% de viabilidade celular representam citotoxicidade.

Os resultados do ensaio de MTT permitiram verificar que a formulação 1-NC apresentou-se citotóxica a partir de $41,81 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ de área superficial enquanto para a 1-NC-Dox foi $6,27 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. Estas formulações foram estatisticamente diferentes entre si nas ASS de 6,27 a $20,91 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$, que se deve devido ao efeito da doxorrubicina encapsulada. A formulação que apresentou maior citotoxicidade foi a 1-NC-Dox. Ainda, os excipientes da formulação foram investigados a fim de observar se algum componente era citotóxico. Neste experimento observou-se que o polissorbato 80 e as nanoesferas de PCL foram atóxicas para MCF-7 nas concentrações testadas, mas o PDMAEMA apresentou pequena citotoxicidade na concentração de 0,677 mM, bem como o TCC a 0,215 mM. Contudo, o PMMA foi considerado o componente mais citotóxico uma vez que os efeitos de redução de viabilidade celular aparecem a partir de 0,296 mM.

Uma vez observados esses resultados e considerando que a literatura cita a PCL e o PDMAEMA como polímeros atóxicos, e que o PDMAEMA já demonstrou possuir toxicidade muito baixa por ser dependente de seu peso molecular ($\leq 10 \text{ kDa}$) e, ainda, que o PMMA também é referenciado como material de baixa toxicidade, optou-se pela otimização do copolímero ARGET com a redução do MMA apenas, obtendo ARGET-B e as nanocápsulas 2-NC e 2-NC-Dox (BOUGARD, 2005; ZHU, 2010; BAINES, 1996).

Ao avaliar a citotoxicidade destas últimas nanocápsulas, observou-se que a 2-NC foi citotóxica a partir de $62,04 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ enquanto a 2-NC-Dox foi a partir de $10,34 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. Entre elas, a 2-NC-Dox foi mais citotóxica que a branca (2-NC)

demonstrando que o efeito citotóxico é decorrente da presença de doxorubicina na nanocápsula.

Ao compararmos ambas formulações contendo doxorubicina com a solução de cloridrato de doxorubicina por concentração, observamos que a solução de doxorubicina e a **1-NC-Dox** foram citotóxicas a partir de 0,22 μM e a solução de cloridrato de doxorubicina foi mais citotóxica.

Já a solução de doxorubicina e a **2-NC-Dox** foram citotóxicas a partir de 0,15 e 0,37 μM , respectivamente, sendo a solução mais citotóxica que a nanocápsula.

Por fim, observamos que a redução da viabilidade celular em 24 horas de experimento, avaliado por ensaio MTT, segue a seguinte ordem: **1-NC-Dox** < **2-NC-Dox** < Solução do cloridrato de doxorubicina. Portanto, a **2-NC-Dox** foi a formulação de escolha, uma vez que contém maior concentração de fármaco e o copolímero utilizado em sua síntese foi otimizado. O efeito citotóxico observado para essa formulação foi inferior ao da solução de doxorubicina, o que se deve, possivelmente, pela liberação controlada promovida pelo carreador, conforme observado por Shuai (2004), com micelas de PCL-MPEG contendo doxorubicina de 0,01 a 10 μM que apresentaram liberação do fármaco em até 5 dias em células MCF-7.

A literatura cita que a doxorubicina causa a morte celular por três mecanismos distintos: senescência (via p53 e aumento da expressão de p21/WAF1, sendo associada à atividade de β -galactosidase), apoptose (ativação de p53/Faz/Caspase-8,9,3 levando a fragmentação do DNA e morte celular) e necrose (aumento da fosforilação da Akt, descondensação da cromatina nuclear e lise de membrana celular), os quais são dependentes de concentração, respectivamente (REBBAA, 2003; YANG, 2001). Para determinar qual o mecanismo de morte que está ocorrendo com a aplicação de nossas nanocápsulas seria necessário um estudo específico para tal.

Como perspectivas, pretende-se avaliar a formulação **2-NC-Dox** em maior tempo de exposição à MCF-7 para comprovar o efeito de liberação prolongado e avaliar o emprego do copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA-IEM-LDV)₂ no desenvolvimento de nanocápsulas brancas e contendo doxorubicina a 10 $\mu\text{g/mL}$, quanto a caracterização físico-química da partícula, sua responsividade frente ao pH

ácido e comportamento citotóxico em células MCF-7 em 24 horas e/ou maior tempo de exposição, bem como, sua internalização por microscopia confocal a laser.

13. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2

Os copolímeros sintetizados (capítulo 1) por técnica ATRP, denominado copolímero MLT20 e, por técnica ATRP-ARGET, denominados copolímeros ARGET-A e ARGET-B, permitiram a obtenção de nanocápsulas com diâmetros nanométricos.

O estudo de pré-formulação evidenciou que as melhores formulações foram: NC3 para o copolímero MLT-20 e, NC17 para o copolímero ARGET-A. Ambas as formulações demonstram ser responsivas ao pH ácido quando diluídas em tampão fosfato de potássio pH 5,5 e analisadas por espalhamento dinâmico de luz em relação à variação de diâmetros. As diferenças da expansão de tamanho se dão devido às diferenças no número de unidades de DMAEMA contidas nos copolímeros.

A seguir, as análises de difração a laser e DLS demonstraram que as nanopartículas **1-NC**, **1-NC-Dox**, **2-NC** e **2-NC-Dox** apresentaram diâmetros inferiores a 100 nm, potencial zeta positivo e expansão frente ao pH ácido. Também, observa-se redução do coeficiente de difusão que é fator indicativo de sua provável difusibilidade da circulação sanguínea ao sítio tumoral por meio de rupturas de endotélio, uma vez em meio biológico. Assim comprova-se o carácter pH-responsivo do DMAEMA por protanação da amina e sua característica catiônica.

O método para quantificação de doxorrubicina por CLAE mostrou-se linear, específico, exato e preciso dentro da faixa de concentrações avaliadas e, **1-NC-Dox** e **2-NC-Dox** apresentaram eficiência de encapsulação da doxorrubicina variando de 60 e 65%, mostrando-se aptas a carrear antineoplásicos a tumores.

Por fim, conforme resultados de citotoxicidade obtidos com as formulações, observou-se que a presença do MMA no copolímero ARGET-A utilizado no preparo das nanocápsulas **1-NC** e **1-NC-Dox**, causou citotoxicidade às células MCF-7.

A otimização do copolímero forneceu o copolímero ARGET-B e este, por sua vez, nanocápsulas (**2-NC** e **2-NC-Dox**) mais seguras e eficazes à veiculação de doxorrubicina às células MCF-7. Ainda, observou-se redução de viabilidade celular

na ordem: **1-NC-Dox** < **2-NC-Dox** < Solução de cloridrato de doxorubicina em 24 horas por MTT.

Os resultados obtidos até o momento indicam que o copolímero PCL-P(MMA-DMAEMA)₂, sintetizado por técnica ATRP-ARGET-B e aplicado ao preparo de nanocápsulas (**2-NC-Dox**), pode ser empregado para carrear antineoplásicos como a doxorubicina à células de câncer de mama.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumor delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 63, p. 170–183. 2011.

AHMAD, M.; USMAN, M.; MADNI, A.; ZUBAIR, M.; QAMAR-UZ-ZAMAN; QUERESHI, M.S.; MUNIR, A.; AHMAD, M.; MAHMOOD, A. A fast and simple HPLC-UV method for simultaneous determination of three anti-cancer agents in plasma of breast cancer patients and its application to clinical pharmacokinetics. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 5, n. 7, p. 915-22. 2011.

ALHARETH, K.; VAUTHIER, C.; GUEUTIN, C.; PONCHEL, G.; MOUSSA, F. HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of Chromatography B*, v. 887-8, p. 128-32. 2012.

ALKHATIB, M. H.; ALBISHI, H. M.. In vitro evaluation of antitumor activity of doxorubicin loaded nanocapsules in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Nanoparticles Research*, v. 15, n.3, p. 1489-1504. 2013.

ANVISA, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RDC 899 de 29/05/2003. In: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

ASPEREN, J. VAN; TELLINGEN, O. VAN; BEIJNEN, J. H.. Determination of doxorubicin and metabolites in murine specimens by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 712, p. 129-43. 1998.

AUFFAN, M.; ROSE, J.; BOTTERO, J.Y.; LOWRY, G.V.; JOLIVET, J.P.; WIESNER, M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, v.4, n.10, p. 634-41. 2009.

BADEA, I.; LAZAR, L.; MOJA, D.; NICOLESCU, D.; TULOSE, A. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 305-9. 2005.

BAINES, F. L.; ARMES, S. P.; BILLINGHAM, N. C.; TUZAR, Z. Micellization of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-*block*-methylmethacrylate) copolymers in aqueous solution. *Macromolecules*, v. 29, p. 8151-9. 1996.

BARANDIARAN, I.; CAPPELLETTI, A.; STRUMIA, M.; ECLIZA, A.; KORTABERRIA, G. Generation of nanocomposites based on (PMMA-*b*-PCL)-grafted Fe₂O₃ nanoparticles and PS-*b*-PCL block copolymer. *European Polymer Journal*, v. 58, p. 226-32. 2014.

BIANCHIN, M. D. *Estudo da influência da composição lipofílica sobre as características físico-químicas de suspensões de nanocápsulas de núcleo*

lipídico. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

BIBBY, D. C.; TALMADGE, J. E.; DALAL, M. K.; KURZ, S. G.; CHYTIL, K. M.; BARRY, S. E.; SHAND, D. G.; STEIERT, M. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice. **Intentional Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 281-90. 2005.

BIERLY, A. **Chemotherapy Using Nanoparticles**. National Institutes Of Health. Disponível em: >file:///g:/np com quimiotericos/bierly, 2011>. Acesso em: 03 Mai 2013.

BOGAERT, H. ; DOUGLAS, P.; MEEREN, P. V. der Improved methods for the analysis of dispersed kinetics in heterogeneous systems, **Journal of Chemical Society Faraday Translational**, v. 88, n.23, p. 3467-3474. 1992.

BOUGARD, F.; JEUSETTE, M.; MESPOUILLE, L.; DUBOIS, P. LAZZARONI, R., Synthesis and supramolecular organization of amphiphilic diblock copolymers combining poly(*N,N*-dimethylamino-2-ethyl-methacrylate) and poly(ϵ -caprolactone). **Langmuir**, v. 23, p. 2339-2345. 2005.

CSABA N.; CAAMAÑO, P.; SÁNCHEZ, A.; DOMINGUEZ, F.; ALONSO, M. J., PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 271-8. 2005.

CHO, K; WANG, X; NIE, S; et al. Therapeutic Nanoparticles For Drug Delivery In Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 1, p. 1310-6. 2008.

CAYRE, O. J.; CHAGNEUX, N.; BIGGS, S. Stimulus responsive core-shell nanoparticles: synthesis and applications of polymer based aqueous systems. **Soft Matter**, v. 7, p. 2211-34, 2011.

CAYRE, O.J.; HITCHCOCK, J.; MANG, M. S.; FINCHAM, S.; SIMÕES, A.; WILLIAMS, R. A.; BIGGS, S. pH-responsive colloidosomes and their use for controlling release. **Soft Matter**, v. 8, p. 4717-24. 2012.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Balancing immune response: crosstalk between adaptative and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 212, p. 1-10. 2007.

DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and prostate câncer: what is the clinical benefit? **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 18, p. 2691-3. 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Ed., São Paulo: Atheneu.1988.

FENG, S. Nanoparticles of Biodegradable Polymers For New – Concept Chemotherapy. **Experimental Review Medical Devices**, v. 1, n. 1, p. 115-25. 2004.

FENG, H.; ZHAO, Y.; PELLETIER, M.; DAN, Y.; ZHAO, Y. Synthesis of photo- and pH-responsive composite nanoparticles using a two-step controlled radical polymerization method. **Polymer**, v. 50, p. 3470-77. 2009.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-4. 1989.

FIEL, L.A.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; NETZ, P.A.; POHLMANN, A.R. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: A quite quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 431, p. 93-104. 2013.

GENNARO, A. R.; GELONE, S.; SELTON, L.; MARDERVIAN, A. D.; BERINGER, P.; GOULPTA, P.; HOOVER, J. E.; POPOVICK, N. G.; REILLEY, W. J.; HENDRICKSON, R. REMINGTON: **The Science and Practice Of Pharmacy**. 21st. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2005.

GOUTAYER, M.; DUFORT, S.; JOSSERAND, V.; ROYÈRE, A.; HEINRICH, E.; VINET, F.; BIBETTE, J.; COLL, J.-L.; TEXIER, I. Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by *in vivo* fluorescent imaging. **European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 75, p. 137-47. 2010.

GOU, M.; ZHENG, X.; MEN, K.; ZHANG, J.; ZHENG, L.; WANG, X.; LUO, F.; ZHAO, Y.; ZHAO, X.; WEI, Y.; QIAN, Z., Poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles: preparation, characterization and application in doxorubicin delivery, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, p. 12928-33. 2009.

GUO, S.; QIAO, Y.; WANG, W.; HE, H.; DENG, L.; XING, J.; XU, J.; LIANG, X.-J.; DONG, A. Poly(ϵ -caprolactone)-graft-poly(2-(N,N'-dimethylamino) ethyl methacrylate) nanoparticles: pH dependent thermo-sensitive multifactorial carriers for gene and drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 6935-41, 2010.

GUO, H.; LAI, Q.; WANG, W.; WU, Y.; ZHANG, C.; LIU, Y.; YUAN, Z. Functional alginate nanoparticles for efficient intracellular release of doxorubicin and hepatoma carcinoma cell targeting therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 451, p. 1-11. 2013.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 203-210. 1989.

HOFFMANN, F.; CINATL, J.; KABICKOVÁ, H.; KREUTER, J.; STIENEKER, F., Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 157, p. 189-98. 1997.

HUANG, Y.; HE, L.; LIU, W.; FAN, C.; ZHENG, W.; WONG, Y.-S.; CHEN, T. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*, v. 34, p. 7106-16. 2013.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), november, 2005.

JAIN, A. K.; SWARNAKAR, N. K.; DAS, M.; GODUGU, C., Augmented anticancer efficacy of doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles after oral administration in a breast cancer induced animal model, *Molecular Pharmaceutics*, v. 8, p. 1140-51. 2011.

JAGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130-40. 2009.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PEZTHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*, v. 8, p. 6646-55. 2012.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J. X.; KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 147-60. 2000.

LEE, E. S.; NA, K.; BAE, Y. H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *Journal of Control Release*, v. 103, p. 405-18. 2005.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, v. 57, p. 3071-78. 1997.

LI, P.-Y.; LAI, P.-S.; HUNG, W.-C.; SYU, W.-J. Poly-(L-lactide)-Vitamin E TPGS nanoparticles enhanced the cytotoxicity of doxorubicin in drug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 2576-82. 2010.

LINCE, F.; BOLOGNESI, S.; STELLA, B.; MARCHISIO, D. S.; DOSIO, F., Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. *Chemical Engineering Research Design*, v. 89, p. 2410-2429. 2011.

MALAM, Y.; LIM, E. J.; SEIFALIAN, A. M. Current trends in the application of nanoparticles in drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1067-78. 2011.

McCLEAN, S.; PROSSER, E.; MEEHAN, E.; O'MALLEY, D.; CLARKE, N.; RAMTOOLA, Z.; BRAYDEN, D. Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 153-63. 1998.

MIAO, J.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; ZHANG, X.-G., HU, F.-Q. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, v. 110, p. 74-80. 2013.

MIGUEL, V. S.; LIMER, A. J.; HADDLETON, D. M.; CATALINA, F.; PEINADO, C. Biodegradable and thermoresponsive micelles of triblock copolymers based on 2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate and ϵ -caprolactone for controlled drug delivery. ***European Polymer Journal***, v. 44, p. 3853-63. 2008.

MISSIRLIS, D.; KAWAMURA, R.; TIRELLI, N.; HUBBELL, J. A.. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 29, p. 120-29. 2006.

MOINARD-CHÉCOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; BENEY, L.; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. ***Journal of Colloid and Interface Science***, v. 317, p. 458-68. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. ***Journal of Immunological Methods***, v. 65, n. 1-2, p. 55-63. 1983.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 385, p. 113-42. 2010.

NICOLAS, J.; MIGUEL, V. S.; MANTOVANI, G.; HADDLETON, D. M. Fluorescently tagged polymer bioconjugates from proteins derived macroinitiators. ***Supplementary Information from Chemical Communications***, p. 4697-9, 2006.

OLIVEIRA, C.P.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. ***Soft Matter***, v. 9, p. 1141-1150. 2013.

PENOTT-CHANG, E.; WALTHER, A.; MILLARD, P.; JAGER, A.; JAGER, E.; MULLER, A. H. E.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Amphiphilic diblock copolymer and polycaprolactone blends to produce new vesicular nanocarriers. ***Journal of Biomedical Nanotechnology***, v. 8, n. 2, p. 1-8. 2012.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. ***Progress in Polymer Science***, v. 36, p. 887-913. 2011.

REBBAA, A.; ZHENG, X.; CHOU, P. M.; MIRKIN, B. L. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. ***Oncogene***, v. 22, p. 2805-11. 2003.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. (a) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymer nanoparticles. ***Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine***, v. 2, p. 8-21. 2006.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. (b) Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate

delivery systems. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, v. 2, p. 53-65. 2006.

RODRIGUEZ-EMMENEGGER, C.; JÄGER, A.; JÄGER, E.; STEPANEK, P.; ALLES, A. B.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BRYNDA, E. Polymeric nanocapsules ultra stable in complex biological media. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 83, p.376-81. 2011.

SAGAR, G. H.; ARUNAGIRINATHAN, M. A.; BELLARE, J. R. Self-assembled surfactante nano-structures importante in drug delivery: A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 45, p. 133-59, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-37. 2003.

SERPE, L.. Convencional Chemotherapeutil Drug Nanoparticles For Cancer Tratament. *Nanotechnologies for The Life Sciences: Nanomaterials For Cancer Therapy*, v.6, p. 1-39. 2006.

SHENOY, D. F.W.; FU, W.; LI, J.; CRASTO, C.; JONES, G.; DIMARZIO, C.; SRIDHAR, S.AMIJI, M., Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery, *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, n. 1, p. 51-7. 2006.

SINECK, J; FRIESBOES, H; ZHENG, X; CRISTINI, V. Two – Dimensional Chemotherapy Simulations Demonstrate Fundamental Transport and Tumor Response Limitations Involving Nanoparticles. *Biomedical Microdevices*, v. 6, n. 4, p. 297-309. 2004.

SOTTANI, C.; RINALDI, P.; LEONI, E.; POGGI, G.; TERAGNI, C.; DELMONTE, A.; MINOIA, C. Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 22, p. 2645-59. 2008.

SCHOENER, C. A. Polymer carriers with amphiphilic properties for the oral delivery of therapeutic agents for cancer treatment. 2012. 381 p. Dissertation, Faculty of the Graduate School of the University of Texas, Austin. 2012.

SHUAI, X.; AJ, H.; NASONGKLA, M.; KIM, S.; GAO, J., Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *Journal of Control Release*, v. 98, p. 415-426. 2004.

TASSONE, P.; TAGLIAFERRI, P.; PERRICELLI, A.; BLOTTA, S.; QUARESIMA, B.; MARELLI, M. L.; GOEL, A.; BARBIERI, V.; COSTANZO, F.; BOLAND, C.R.; VENUTA, S. BRCA I Expression modulates chemosensitivity of BRCA I-defective HCC1937 human breast câncer cells. *British Journal of Cancer*, V. 88, P. 1285-91. 2003.

TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, v. 56, p. 279-285. 1987.

VALENTE, L.; VALE, L. J. del; CASAS, M. T.; FRANCO, L.; RODRÍGUEZ-GALÁN, A.; PUIGALLÍ, J.; MARCHISIO, D., Nanospheres and nanocapsules of amphiphilic copolymers constituted by methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate and hexadecyl cyanoacrylate units. *eXPRESS Polymer Letters*, v. 7, n. 1, p. 2-20. 2013.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 375, p. 200-8. 2011.

VERDUN, C.; BRASEUR, F.; VRANCKX, H.; CROUVEUR, P.; ROLAND, M., Tissue distribution of doxorubicin association with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 26, p. 13-18. 1990.

WEI, G.; XIAO, S.; SI, D.; LIU, C. Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. *Biomedical Chromatography*, v. 22, p. 1252-58. 2008.

WILSON, J. K.; SARGENT, J. M.; ELGIE, A. W.; HILL, J. G.; TAYLOR, C. G., A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *British Journal of Cancer*, v. 62, p. 189-194. 1990.

YANG, X.-H.; SLADEK, T. L.; LIU, X.; BUTLER, B. R.; FROELICH, C. J.; THOR, A. D. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Research*, v. 61, p. 348-54, 2001.

YUK, S. H.; CHO, S. H.; LEE, S. H. pH/Temperature-responsive polymer composed of poly((N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide). *Macromolecules*, v. 30, p. 6856-9. 1997.

ZHANG, H.; HONG, K.; MAYS, J. W. Synthesis of block copolymers of styrene and methyl methacrylate by conventional radical polymerization in room temperature ionic liquids. *Macromolecules*, v. 35, p. 5738-41. 2002.

ZHU, C. ; JUNG, S.; LUO, S.; MENG, F.; ZHU, X.; PARK, T. G.; ZHONG, Z., Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers, *Biomaterials*, v. 31, p. 2408-16. 2010.

15. DISCUSSÃO GERAL

Foi possível sintetizar o macroiniciador bromado Br-PCL-Br a partir de PCL de 14kDa, o qual foi empregado na copolimerização de monômeros acrílicos por técnica ATRP-ARGET, obtendo os copolímeros ARGET-A e ARGET-B, com diferentes composições em termos de concentração de MMA.

Estes copolímeros foram utilizados para a formação de nanocápsulas de núcleo lipídico para a encapsulação de doxorubicina, sendo as nanocápsulas avaliadas quanto a suas características físico-químicas, capacidade de expansão em diferentes pH (pela presença do DMAEMA no copolímero) e citotoxicidade por ensaio de MTT frente à células MCF-7 de câncer de mama.

Foi observado a responsividade das nanocápsulas ao pH ácido, com redução do coeficiente de difusão e expansão de diâmetros de 60 nm para 100 nm, eficiência de encapsulação acima de 60% e potencial zeta positivo.

As nanocápsulas apresentaram citotoxicidade às células MCF-7 inferior a da solução de cloridrato de doxorubicina em 24 horas de tratamento por MTT, possivelmente por efeito de liberação prolongada segundo relatado por Shuai (2004). Entretanto, a presença da doxorubicina encapsulada demonstrou maior citotoxicidade das formulações em comparação às nanocápsulas sem fármaco.

Logo, nanocápsulas de PCL-P(MMA-DMAEMA)₂ representam promissores sistemas de carregamento de antineoplásicos à tumores, passíveis de serem funcionalizados por moléculas como peptídios e serem avaliados para a vetorização ativa à integrinas.

16. CONCLUSÃO GERAL

A possibilidade da funcionalização molecular do macroiniciador (Br-PCL-Br) e, a construção de blocos poliméricos a partir de monômeros pH-responsivos (PCL-P(MMA-DMAEMA)₂) possibilita novas aplicações biológicas como o emprego em sistemas de carreamento de fármacos para o tratamento do câncer.

Foi possível obter nanocápsulas de núcleo lipídico a partir deste material em diâmetros inferiores a 100 nm, comprovar a resposta das nanocápsulas nos diferentes pHs e realizar a avaliação de citotoxicidade do sistema, de seus excipientes e fármaco (doxorubicina) sobre células de câncer de mama (MCF-7).

Foi observada a necessidade de otimização da síntese do copolímero para a redução de toxicidade do carreador e posteriormente, obteve-se a resposta citotóxica das nanocápsulas sobre células de câncer.

17. ANEXOS

17.1 Produtos de partida:

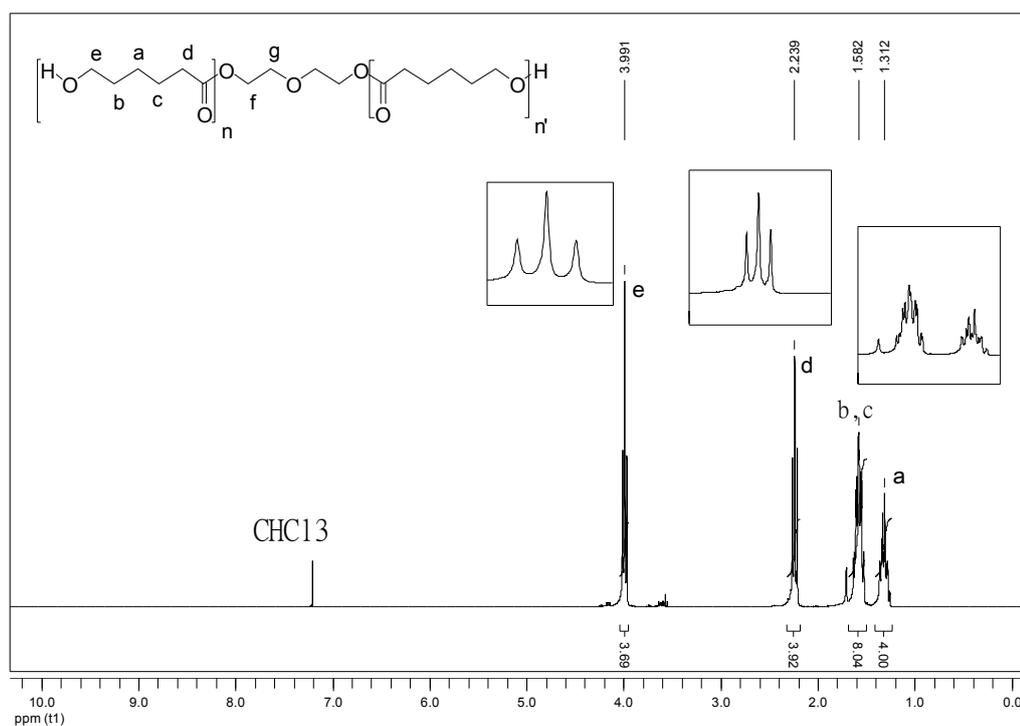
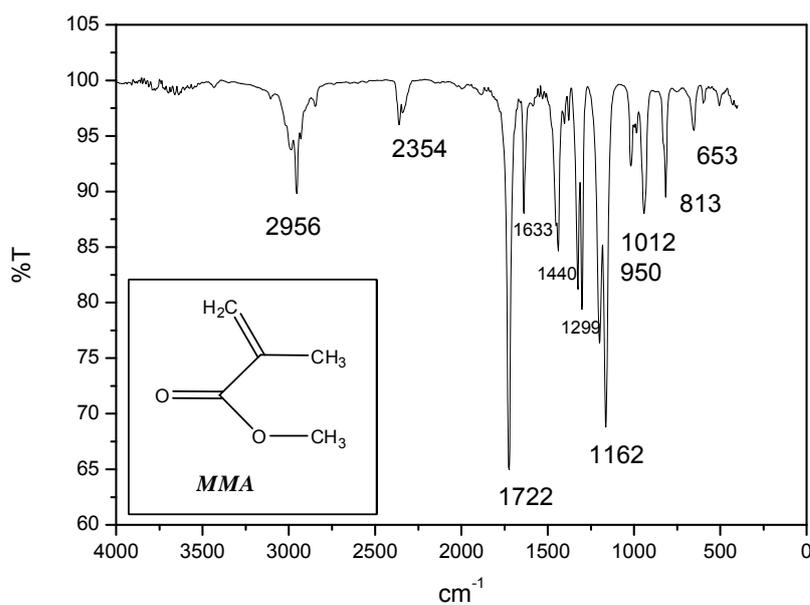
Figura 59: Espectro de RMN ^1H de PCL (CDCl_3 , 300 MHz).

Figura 60. Estrutura química e espectro de infravermelho do MMA.

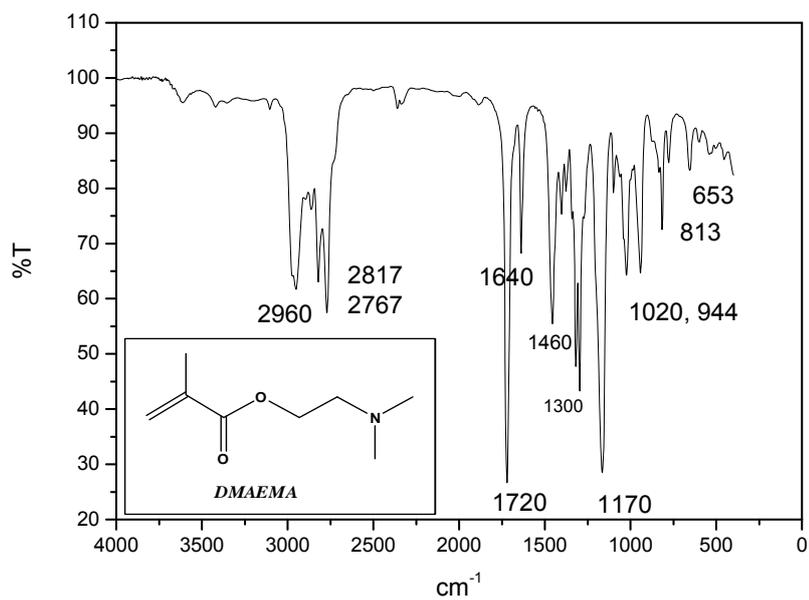


Figura 61. Estrutura química e espectro de infravermelho do DMAEMA.

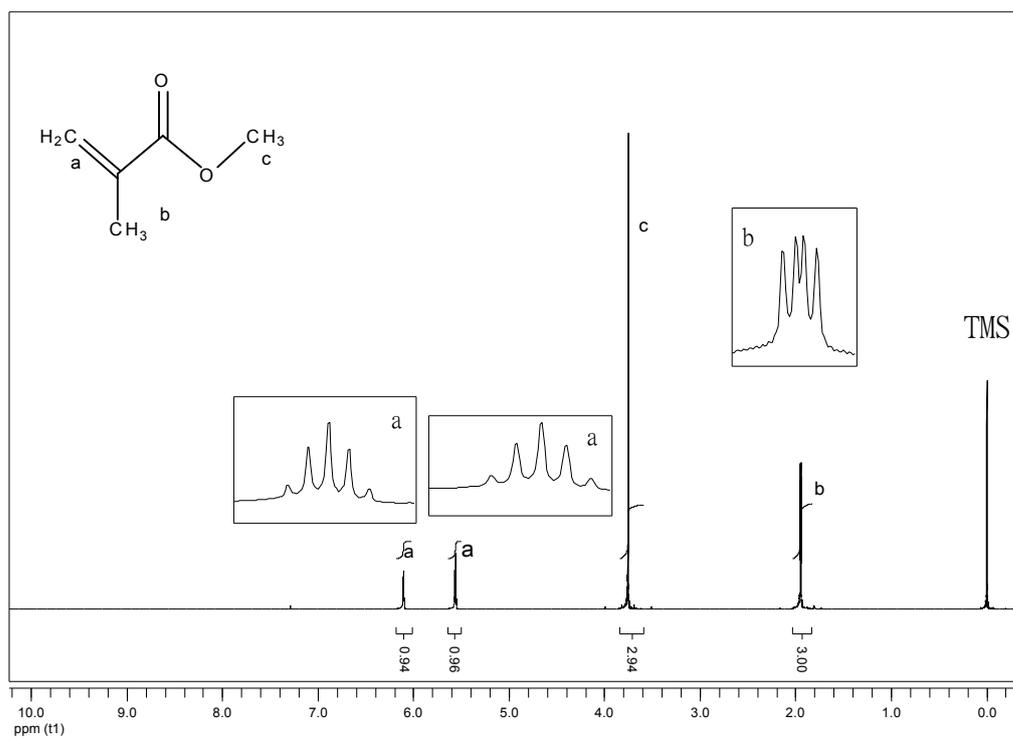


Figura 62. Espectro de RMN ^1H do MMA (CDCl_3 , 300 MHz).

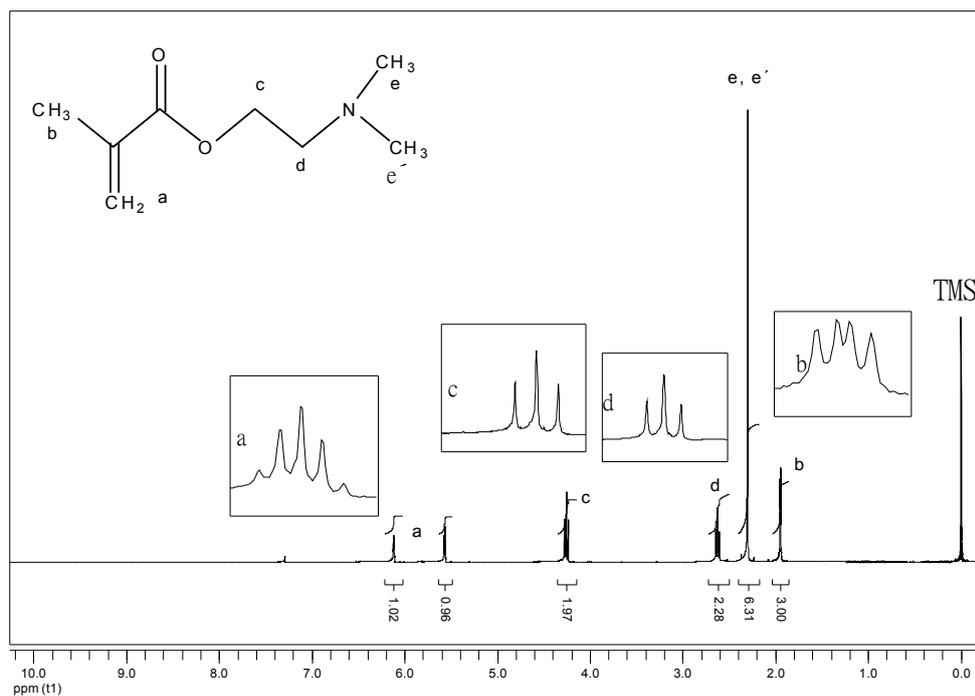


Figura 63. Espectro de RMN ¹H do DMAEMA (CDCl₃, 300 MHz).

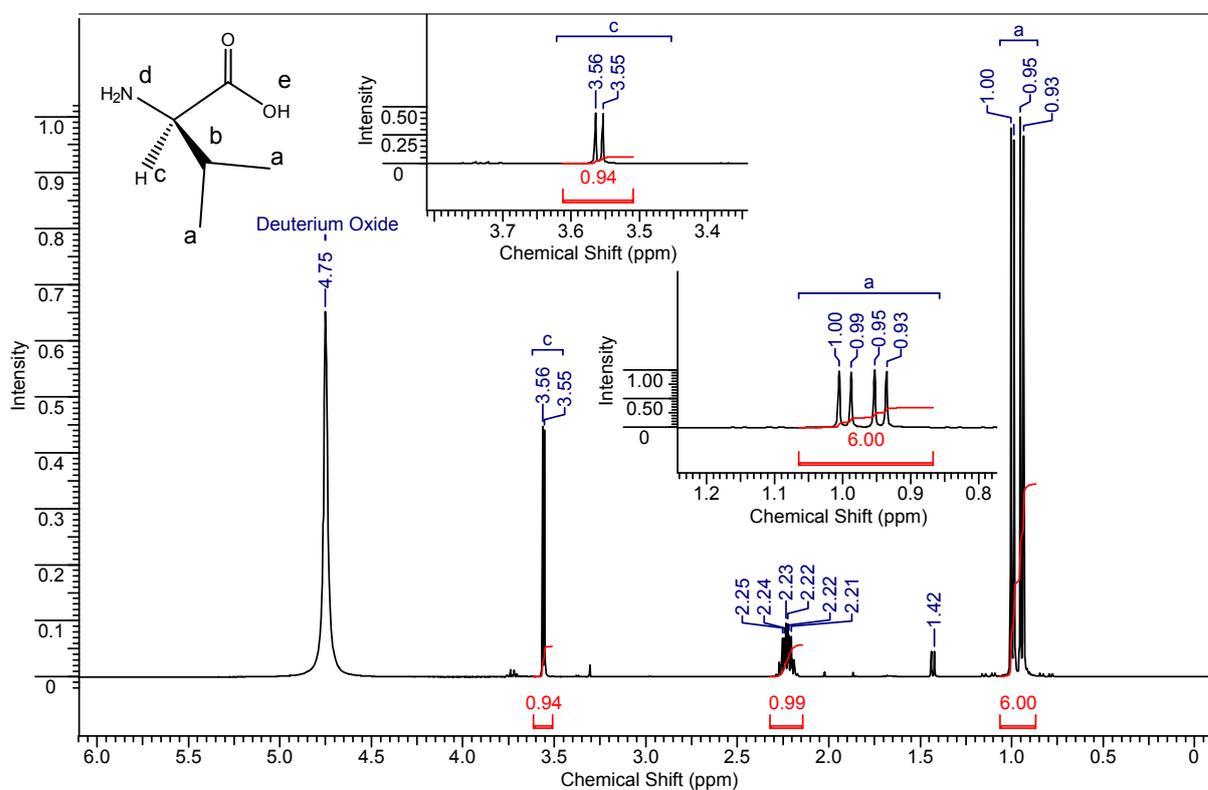


Figura 64. Espectro de RMN ¹H da L-valina (D₂O, 300 MHz).

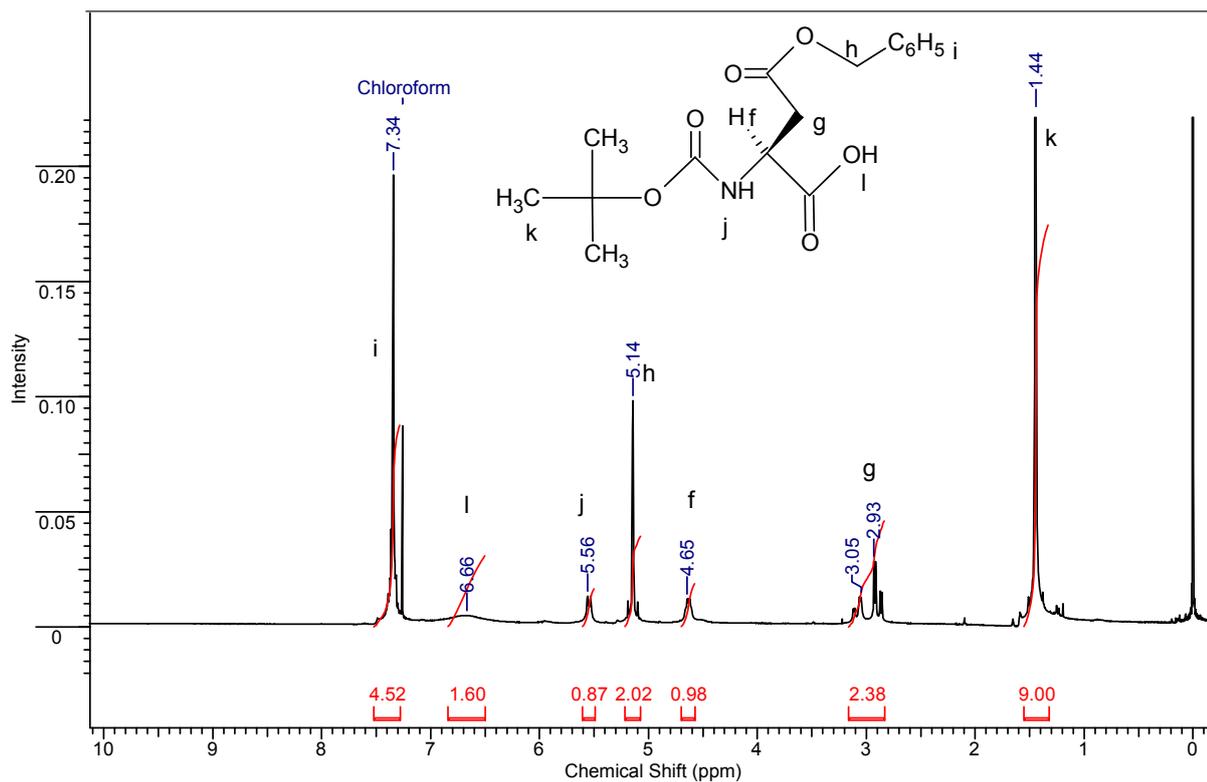


Figura 65. Espectro de RMN ^1H do aminoácido BocAsp(OBn)OH (CDCl_3 , 300 MHz).

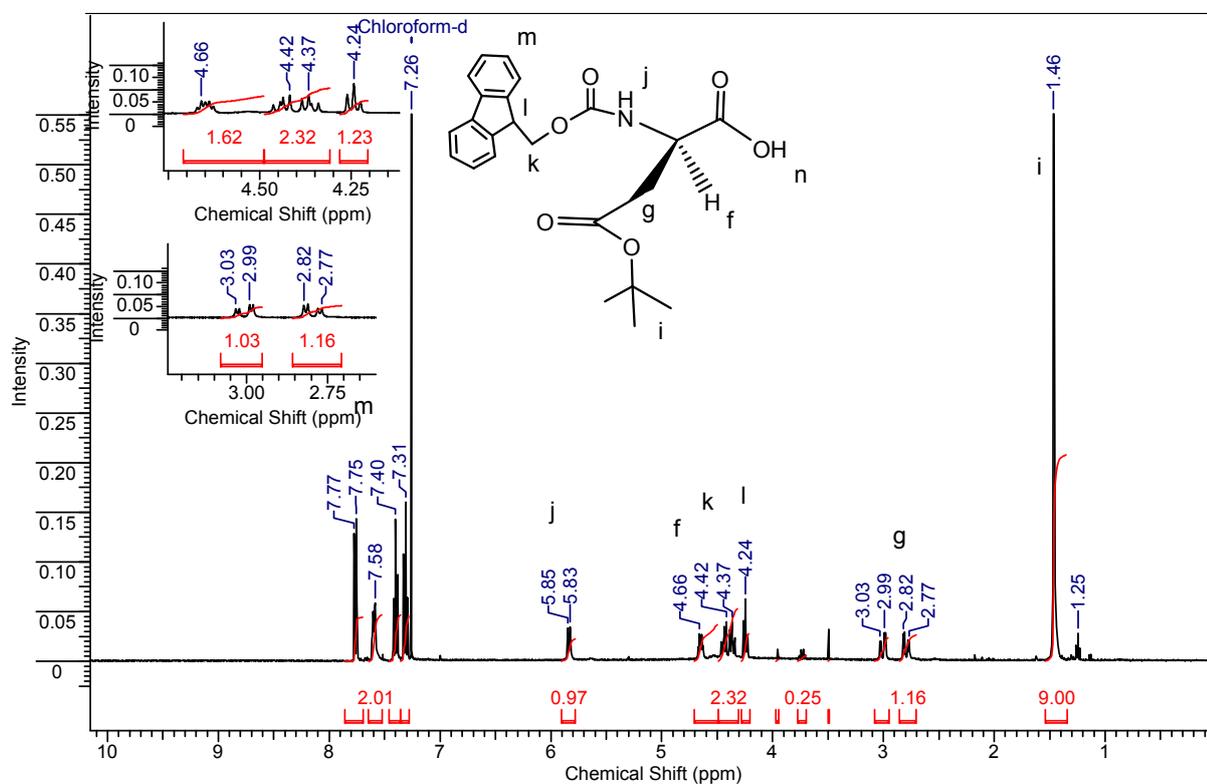


Figura 66. Espectro de RMN ^1H do aminoácido FmocAsp(OtBu)OH (CDCl_3 , 300 MHz).

17.2 Produtos reacionais:

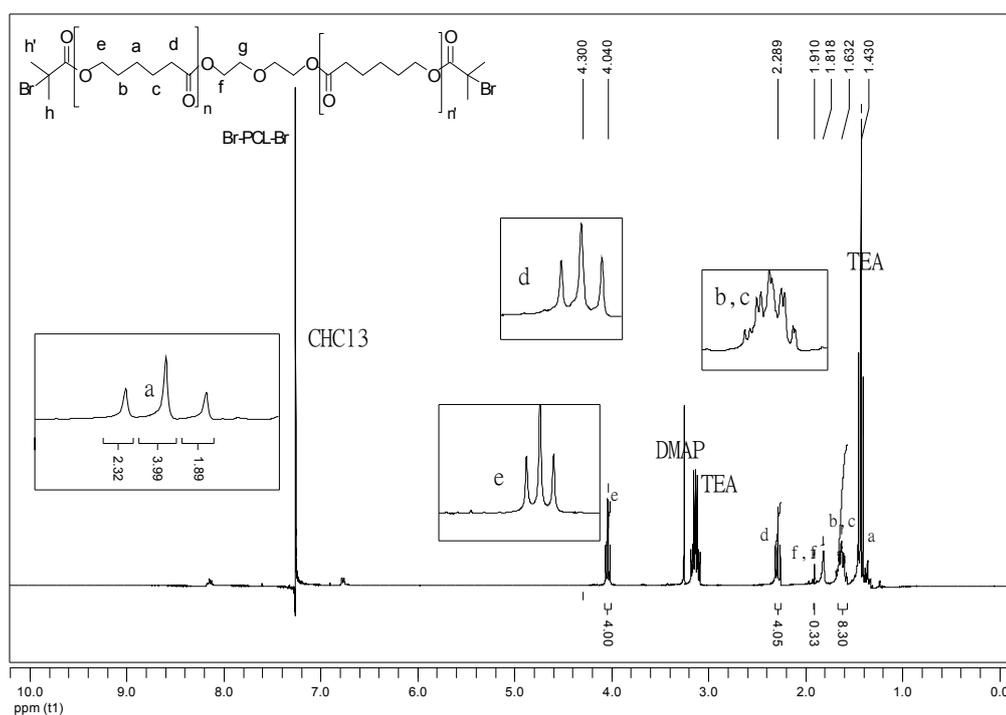


Figura 67. Espectro de RMN ^1H da Br-PCL-Br (MIAT1, CDCl_3 , 300 MHz).

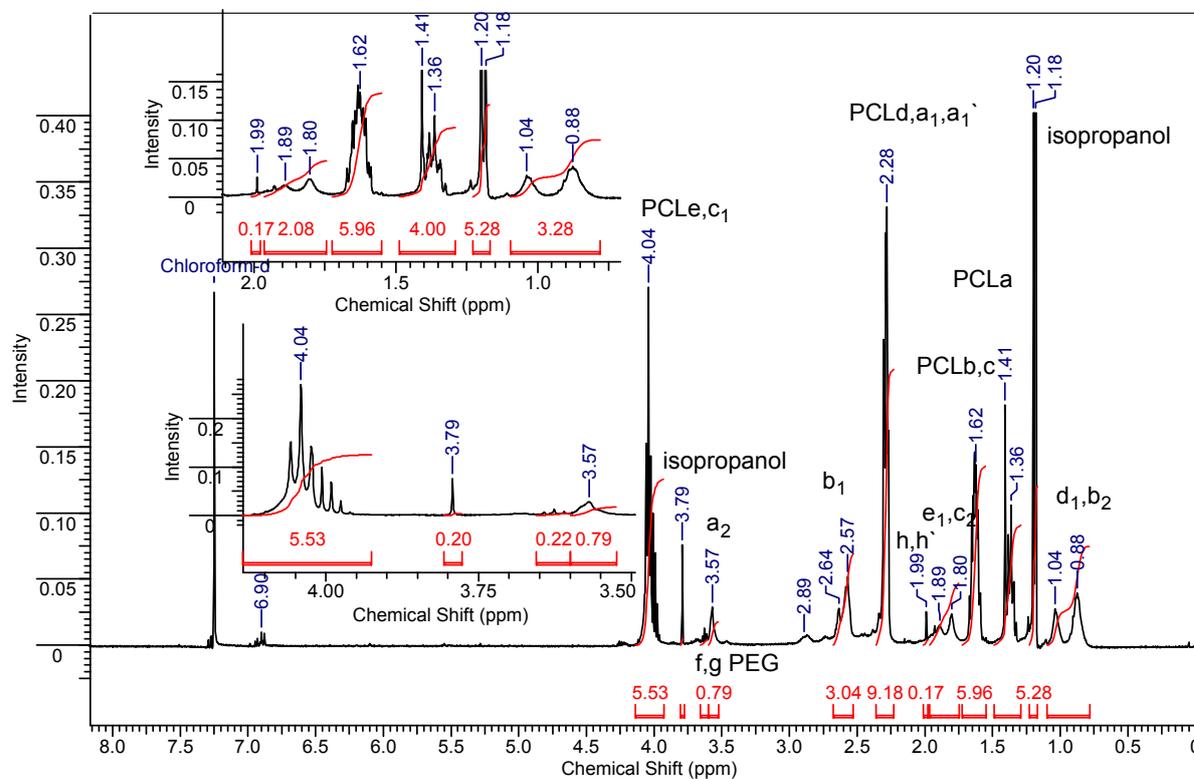


Figura 68. Espectro de RMN ^1H do ARGET-A tratado com isopropanol (manutenção de funcionalidade em 1,90 ppm, CDCl_3 , 300 MHz).

17.3 Reações não citadas no corpo da tese:

17.3.1 Síntese e caracterização dos homopolímeros:

Os homopolímeros PMMA e PDMAEMA foram sintetizados por polimerização radicalar livre convencional, conforme a metodologia de Zhang et al (2002), com o objetivo de investigar a citotoxicidade dos excipientes empregados nas nanocápsulas. A síntese envolveu o uso de AIBN (azobisisobutironitrila) como iniciador (15 mg, 0,09 mmol), os monômeros (1,2 g de MMA ou DMAEMA) e 5 mL de tolueno, sob atmosfera de argônio por 15 minutos, a 70°C durante 6 horas. Os polímeros foram isolados por precipitação em éter gelado.

IV_{PMMA} : 3401, 2949, 1727, 1444, 1239, 1189, 1149 cm^{-1} . GPC: PMMA: $M_w = 25,42$, $M_n = 12,28$ e $PDI = 2,07$. RMN $^1H_{PMMA}$: δ 0,83-1,19 ppm (s, 3H_a), δ 1,43 ppm (m, 1 H_{AIBN}), δ 1,60 ppm (s, 1H_d), δ 1,80 ppm (m, 2H_b) e δ 3,58 ppm (s, 3H_c).

$IV_{PDMAEMA}$: 3316, 2950-2788, 1725, 1457, 1274, 1157, 1062, 958 cm^{-1} . GPC: PDMAEMA: $M_w = 15,11$, $M_n = 6,19$ e $PDI = 2,44$. RMN $^1H_{PDMAEMA}$: δ 0,86-1,03 ppm (s, 3H_a), δ 1,40 ppm (s, 1H_{AIBN}), δ 1,79 ppm (2H_b), δ 2,26 ppm (s, 6H_{f,f}), δ 2,55 ppm (m, 2H_e), δ 4,03 ppm (s, 2H_c).

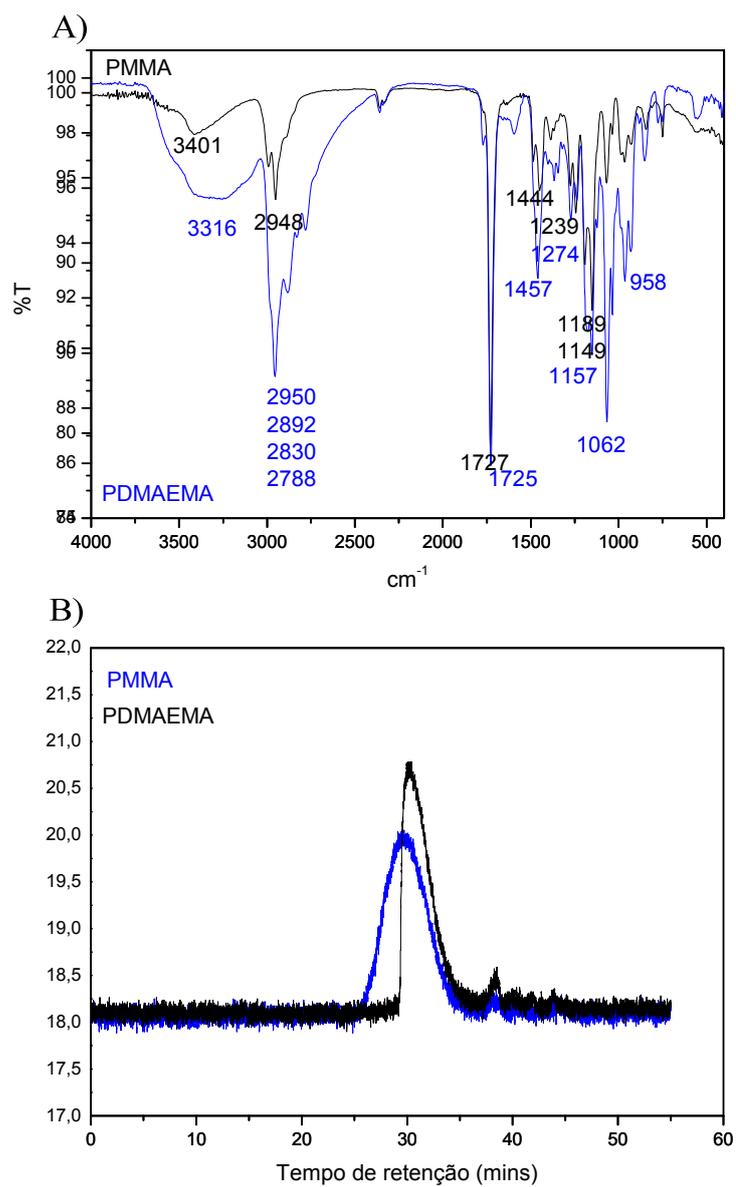


Figura 69. Infravermelho (A) e GPC (B) dos homopolímero PMMA e PDMAEMA.

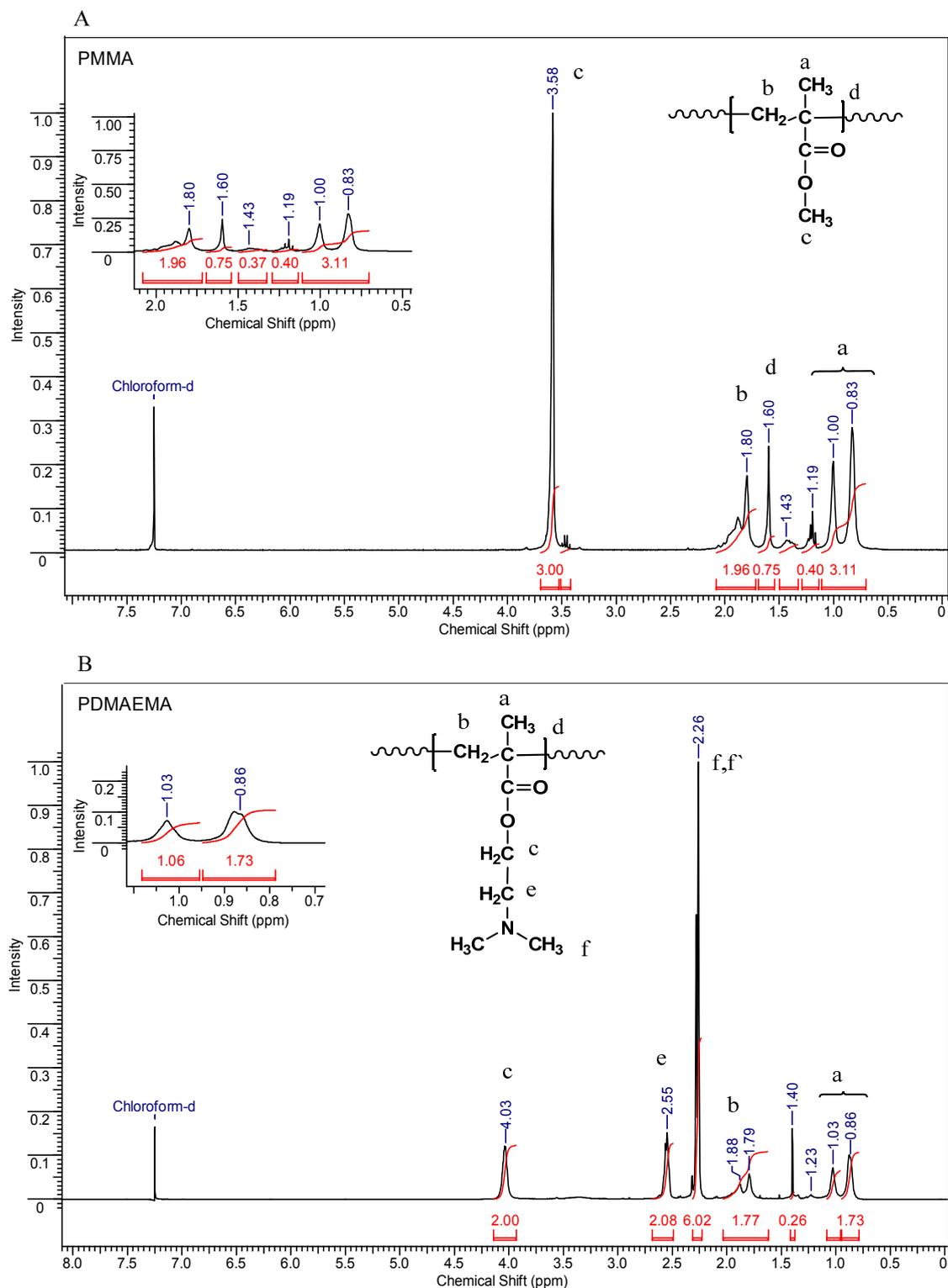


Figura 70. Espectro de RMN ^1H do PMMA (A) e PDMAEMA (B) (CDCl_3 , 300 MHz).

17.3.2 Síntese do copolímero PCL-P(DMAEMA-Br) $_2$ por ATRP (denominado cf01):

A síntese do tribloco procedeu-se com a total ausência de monômeros MMA, em razão molar de DMAEMA:Br-PCL-Br:CuBr:PMDTA (60:1:3:4), a partir do

macroiniciador MIAT1. Empregou-se a técnica ATRP em massa, segundo adaptações dos trabalhos de Montala-Timol (2007a), Miguel et al (2008) e Jiang (2010). Em um balão foram colocados brometo de cobre (CuBr(I), 22 mg, 0,15 mmóis), N,N,N',N',N"-pentametildietilenotriamina (PMDETA, 38 mg, 0,22 mmóis), DMAEMA (0,5 g, 3,2 mmóis) e macroiniciador Br-PCL-Br (0,6 g, $5,5 \cdot 10^{-2}$ mmóis). A reação foi realizada em atmosfera inerte de argônio, a 25°C. Mantendo-se a injeção de argônio, a agulha de entrada foi retirada do material reacional, mas mantida dentro do balão e, sobre a agulha de saída acoplou-se uma seringa preenchida com cloreto de cálcio anidro. Após, procedeu-se o congelamento do material reacional em nitrogênio líquido, por aproximadamente um minuto e, o balão foi retirado do nitrogênio para descongelamento e expulsão de oxigênio do meio reacional (procedimento repetido três vezes). A seguir, o balão foi colocado a 70°C por 1 hora, sob agitação. A reação foi finalizada por exposição ao ar e adição de 3 mL de THF. O produto obtido foi tratado em coluna de sílica gel 60, precipitado em ciclohexano e seco em dessecador. O rendimento da reação foi de 12% (mol).

$IV_{\text{(filme sobre cristal NaCl)}}$: 3424, 2940-2759, 1722 cm^{-1} . $GPC_{\text{(THF)}}$: $M_n = 8,7$ kDa, $M_w = 10,7$ kDa, PDI = 1,23. $GPC_{\text{(CHCl}_3\text{)}}$: $M_n = 6,0$ kDa, $M_w = 8,6$ kDa, PDI = 1,45. $\eta_{\text{acetona}} = 0,41$ mPa.s/22°C. RMN^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,9 (s, $4H_d$), δ 1,3 (m, $2H_{\text{PCL}}$), δ 1,6 (m, $4H_{\text{PCL}}$), δ 1,9 (s, $2H_e$), δ 2,3 (s, $12H_{a,a',\text{PCL}}$), δ 2,6 (s, $4H_b$), δ 4,0 (s, $5H_{c,\text{PCL}}$).

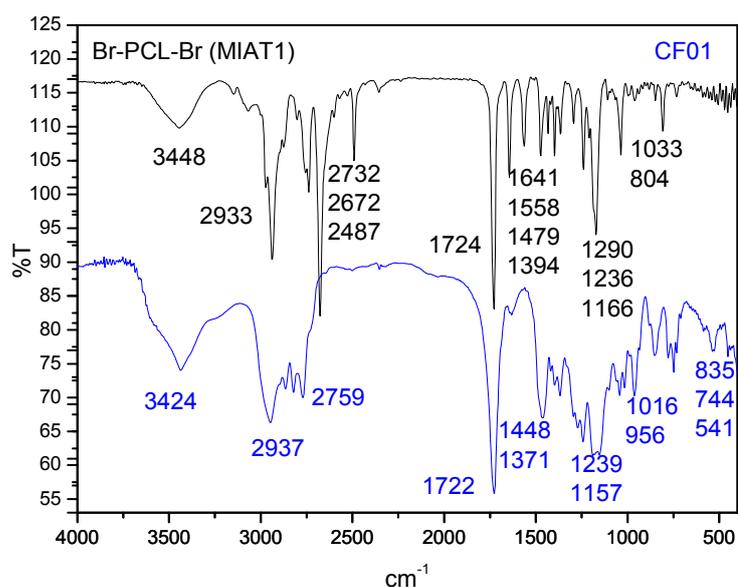


Figura 71. Espectro de infravermelho de cf01 e seu macroiniciador (MIAT1).

conforme Montala-Timol (2007 a, b), Guo (2010) e Zhu (2010). Em um frasco Schlenk (50 mL) pesou-se 14 mg de CuBr (0,09 mmóis) e 27 mg de PMDETA (0,15 mmóis), sendo o frasco selado com tampa. Após, procedeu-se três ciclos de vácuo/argônio a t.a., sendo o primeiro ciclo de 30 minutos em vácuo e 30 minutos em argônio, o segundo e terceiro ciclos de 15 minutos em vácuo e 15 minutos em argônio. Adicionou-se 0,5 g de DMAEMA (3,18 mmóis) à reação e após 10 minutos adicionou-se, por meio de cânula, 0,3 g de Br-PCL-Br (0,027 mmóis, MIAT1) em 5 mL de THF seco. A reação foi mantida em banho a 70°C por 24h. O produto reacional foi precipitado em ciclohexano sobre banho de gelo. O precipitado sólido com coloração esverdeada foi recolhido por filtração. A razão molar de DMAEMA:Br-PCL-Br:CuBr:PMDETA foi de 106:1:3:5 e o rendimento obtido foi $\leq 30\%$ (mol).

IV_(filme sobre cristal NaCl): 3444, 2948, 2730, 1720 cm^{-1} . GPC: $M_n = 10,5$ kDa, $M_w = 12,2$ kDa, PDI = 1,16. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,9 (s, 2H), δ 1,2 (s, 6H_i), δ 1,4 (m, 12H_{e+PCL}), δ 1,6 (m, 25H_{PCL}), δ 2,2 (m, 17H_{a,a',d,PCL}), δ 3,6 (s, 4H_b), δ 4,0 (t, 8H_{c+PCL}).

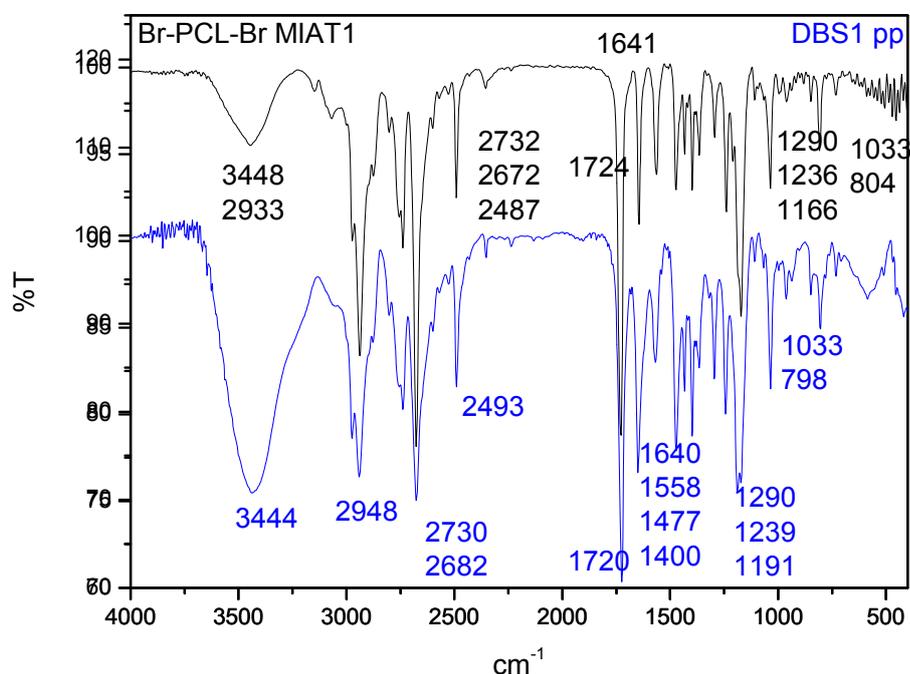


Figura 74. Espectro de infravermelho de DBS.

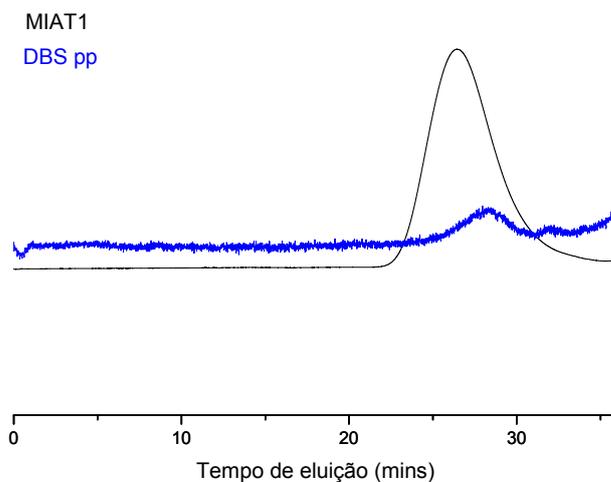


Figura 75. Curva de GPC de DBS e seu macroiniciador MIAT1.

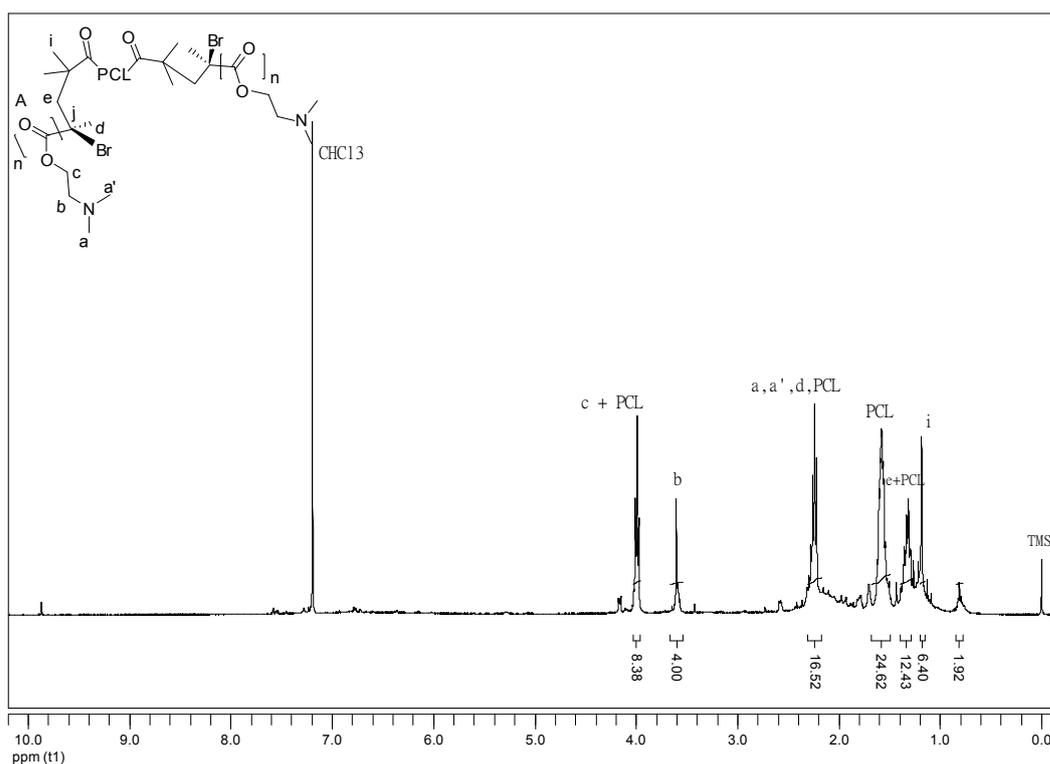


Figura 76: Espectro de RMN ^1H de DBS (CDCl_3 , 300 MHz).

16.3.4 Estratégia 1: Composta de cinco etapas: a primeira é a ligação do éster metílico de leucina ($\text{HCl}\cdot\text{Leu}(\text{OMe})$) com IEM, conforme adaptações da metodologia de Ayres et al (2005), obtendo IEM-Leu(OMe). Para tal, em um balão foi adicionado 0,5010g de $\text{HCl}\cdot\text{Leu}(\text{OMe})$ (2,77 mmol), 30 mL de água MiliQ e solução de NaOH 1 M sob agitação até atingir pH 9,6 (referente ao $\text{pK}_{\text{a}2}$ da leucina), a 25°C . Após, 700

μL do IEM (conforme adquirido comercialmente, sem prévio tratamento, 4,95 mmol) foi adicionado gota a gota, sob agita o. A rea o foi mantida por 3 horas a t.a. e acompanhada por CCD (ciclohexano:acetato de etila 2:1), apresentando $R_f = 2,2$. A rea o foi lavada 2 vezes com 5 mL diclorometano e,   fase orgânica foi adicionado HCl a 1 M até atingir $\text{pH} = 1$. Finalmente o produto foi extraído com 3x 5 mL de butanol e a fase orgânica foi rotaevaporada (Rendimento = 28% (mol)).

IV: 3348, 2953-2870, 1716, 1633-1558, 1448, 1292, 1165 cm^{-1} . RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,92 ppm (m, 6 H_a), δ 1,37-1,59 ppm (m, 9 $H_{b,c}$), δ 1,93 ppm (s, 3 H_j), δ 3,50 ppm (m, 2 H_h), δ 3,64 ppm (s, 3 H_e), δ 4,10-4,20 ppm (2t, 4 $H_{d,i}$, $^3J_{H_d-H_c} = 6,74$ Hz e $^3J_{H_i-H_h} = 5,57$ Hz), δ 4,31-4,43 ppm (2m, 2 $H_{f,g}$), δ 5,58-6,12 ppm (2s, 2 H_k).

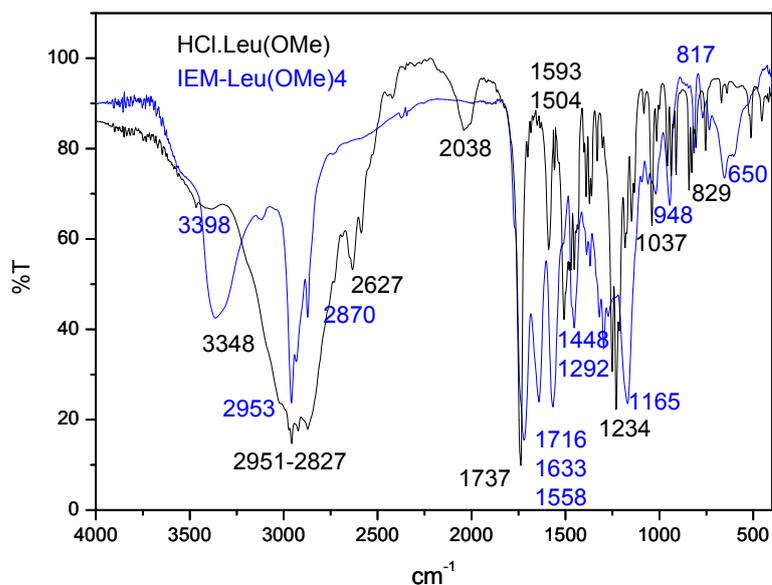


Figura 77. Infravermelho de IEM-Leu(OMe).

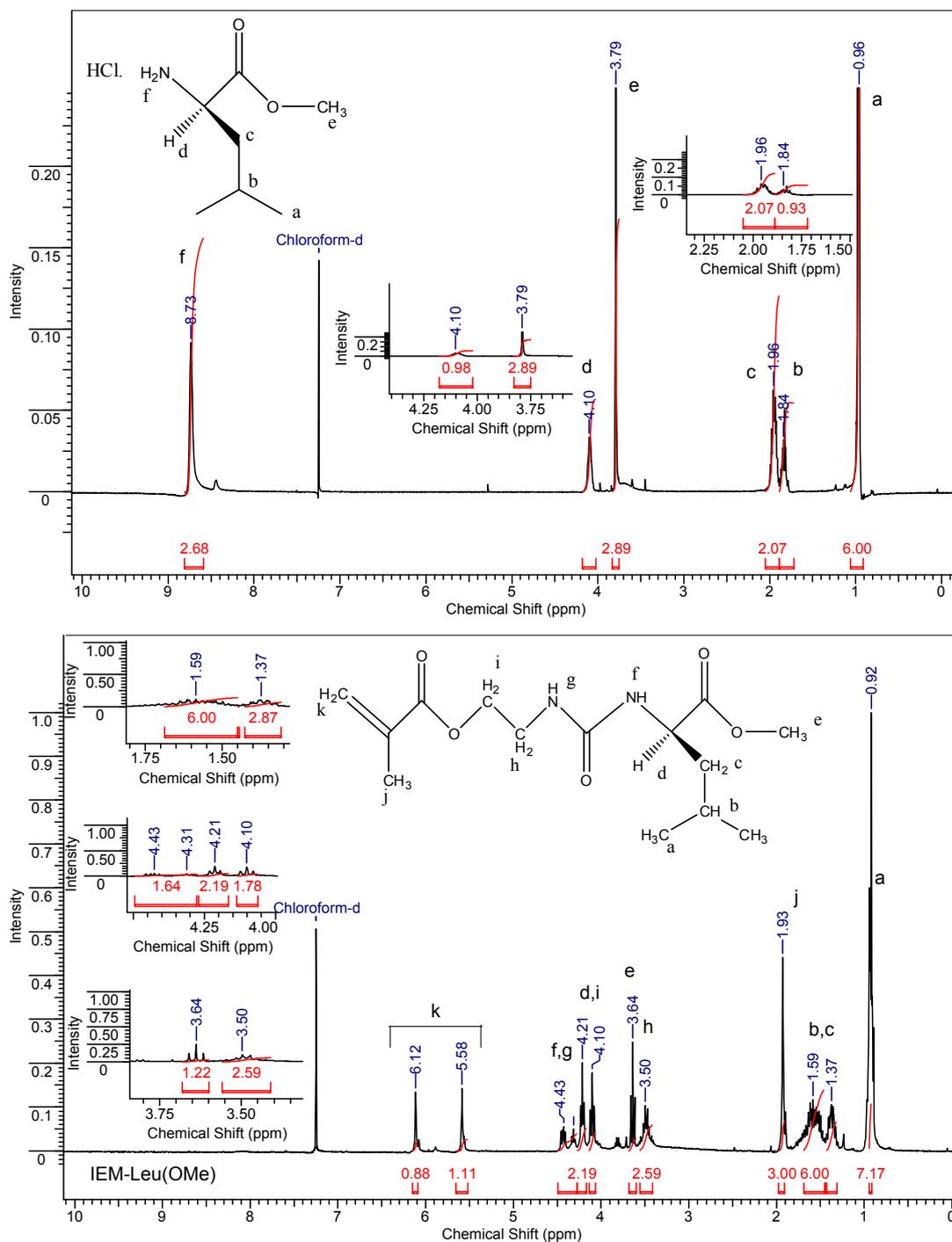


Figura 78. RMN ¹H de HCl.Leu(OMe) e IEM-Leu(OMe) (CDCl₃, 300 MHz).

A seguir, as demais etapas (que não foram realizadas): Desproteção do grupamento Fmoc do dipeptídeo e purificação, desproteção do éster metílico da leucina, obtendo IEM-LeuOH (segundo Ayres et al (2005)), reação do IEM-LeuOH com o dipeptídeo (NH₂-Asp(OtBu)ValOMe), obtendo IEM-LD(OtBu)V(OMe) e reação do IEM-LD(OtBu)V(OMe) com o copolímero PCL-b-P(MMA-DMAEMA)₂ por método

ATRP-ARGET(B). O tripeptídeo LDV adquirido comercialmente foi recebido em nosso laboratório, mudando as sínteses para a estratégia 2.

