

João Paulo Henriques Figueiredo

# **Estudo da libertação controlada de fármacos em nanopartículas de PEG-PLA ativadas por luz**

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra  
para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientador(es):

Prof. Dr. Arménio Coimbra Serra (DEQ - UC)

Prof. Dr. Jorge Fernando Jordão Coelho (DEQ - UC)

Setembro de 2018



Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:

Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade de Coimbra



Grupo de Polímeros PolySyc (DEQ - UC)





Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.



# Agradecimentos

Desde logo, um muito obrigado aos meus orientadores de tese, o Professor Doutor Arménio Coimbra Serra e a aluna de doutoramento Camila Dariva, que sempre se mostraram disponíveis para ajudar a ultrapassar todas as dificuldades com que me fui deparando. Foram orientadores na verdadeira ascensão da palavra.

Queria também agradecer ao Grupo de Polímeros do DEQ-UC por toda a alegria que mostraram ao longo desta caminhada. Desde o primeiro dia que me integraram no laboratório como se de um membro daquele grupo fizesse parte e sempre se interessaram por dispor de todas as condições para que desenvolvesse o meu trabalho.

A nível pessoal, um muito obrigado a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para as histórias vividas nesta linda cidade, a todos aqueles que, comigo, construíram as memórias do meu percurso académico. A todos os meus amigos de Águeda, em especial aos Rauis, que são o que de melhor representa a amizade e companheirismo, sempre disponíveis para ouvir os meus problemas e fazerem-me sentir, de algum modo, como alguém especial.

À minha namorada, o maior suporte desta caminhada, aquela que esteve em todos os momentos, que sempre me fez ouvir as palavras certas e que sempre procurou ajudar a ser melhor em tudo na vida. Com ela as adversidades foram mais facilmente superadas.

E por fim, a minha enorme família, aos meus pais, ao meu querido irmão, aos meus avós, tios e primos, são também eles a base do sucesso na minha caminhada. A sua presença fez-se sentir em todos os segundos da minha vida, e é também por eles que vivi com intensidade a última etapa da minha vida estudantil.

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para que isto fosse possível, um muito obrigado!

*João Figueiredo*

*“The important thing in science is not so much  
to obtain new facts as to discover new  
ways of thinking about them.”  
- William Lawrence Bragg*



# Resumo

Os sistemas de libertação controlada de fármacos à base de polímeros têm sido estudados, por contribuírem para uma maior especificidade, redução da toxicidade, e melhorarem as características de solubilidade dos fármacos com características hidrofóbicas. O fenómeno de *self-assembly* de polímeros tem papel de destaque por permitir o processo a encapsulação do fármaco. Para um efetivo sistema libertador é necessário também garantir a estabilidade do mesmo desde a administração até à libertação do fármaco, por ação de um estímulo externo, de forma rápida e eficiente. A biocompatibilidade e biodegradabilidade dos copolímeros é também fundamental para a eficácia do sistema formado. Devido à sua inocuidade na zona do visível e capacidade de penetração tecidual, a luz como estímulo externo, revela-se uma estratégia muito interessante para provocar a destruição de nanopartículas.

Assim, a presente dissertação descreve um sistema de libertação controlada à base de copolímeros de bloco PEG-PLA, com um segmento sensível ao oxigénio singuleto que tem a capacidade de encapsular e libertar a doxorrubicina usada como fármaco. Aqui, as nanopartículas do tipo micelar, pela ação das porfirinas, reagem à luz de elevado comprimento de onda (superior a 600 nm) de modo a libertar o material encapsulado de forma rápida. Assim sendo, a este processo de libertação poderá trazer benefícios ao nível da seletividade de fármacos anti tumorais com toxicidade elevada, permitindo que a sua especificidade seja alcançada num alvo específico que seja irradiado.

Os objetivos do projeto centram-se no desenvolvimento de copolímeros de bloco unidos pelo segmento sensível ao oxigénio singuleto, SegS, procedido pela análise da capacidade de *self-assembly* dos copolímeros preparados. Posteriormente determinou-se a capacidade de encapsulação das nanoestruturas e realizou-se o estudo de libertação da doxorrubicina após incidência de luz vermelha.

Os resultados sugerem que as nanopartículas desenvolvidas são eficientes no sentido em que apresentaram baixa polidispersividade e capacidade de encapsulação da doxorrubicina segundo o método de diálise. Após irradiação por laser de 650 nm, as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>, evidenciaram uma taxa de cinética de libertação

significativa nos instantes iniciais que tornam o sistema de liberação de fármacos promissor na terapia fotodinâmica.

Palavras chave: biocompatibilidade, poli(etileno glicol), poli(ácido láctico), encapsulação, liberação.

# Abstract

Controlled drug delivery systems based on polymers have been studied because they increase specificity, reduce toxicity and improve the solubility characteristics of drugs with hydrophobic characteristics. The self-assembly technique of polymers stands out because it allows the encapsulation of the drug. For an effective release system, it is also necessary to guarantee the drug stability from the administration until the drug release, by the action of an external stimulus, quickly and efficiently. The copolymers biocompatibility and biodegradability is also important to the effectiveness of the system. Due to its innocuity in the visible zone and capacity of tissue penetration, light as an external stimulus, proves to be a very interesting strategy to cause the destruction of nanoparticles.

Thus, the present dissertation describes a controlled release system based on PEG-PLA block copolymers with a singlet oxygen sensitive segment that has the ability to encapsulate and release doxorubicin used as a drug. Here, micellar nanoparticles, by the action of porphyrins, react to high wavelength light (greater than 600 nm) in order to release the encapsulated material quickly. Thus, this release process may bring benefits to the level of selectivity of antitumor drugs with high toxicity, allowing their specificity to be achieved in a specific target that is irradiated.

The objectives of this project are the development of block copolymers bound by the singlet oxygen-sensitive segment, SegS, carried out by analyzing the self-assembly capacity of the prepared copolymers. Subsequently, the nanostructures were encapsulated and the doxorubicin release study was performed after red light.

The results suggest that the developed nanoparticles are efficient since they presented low polydispersity and doxorubicin encapsulation capacity according to the dialysis method. After 650 nm laser irradiation, the PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> nanoparticles evidenced a significant rate of release kinetics at the initial instants that makes the drug delivery system promising in photodynamic therapy.

Keywords: biocompatibility, poly(ethylene glycol), poly(lactic acid), encapsulation, release.



# Nomenclatura e Acrónimos

## Nomenclatura

G	- Grama
$D_T$	- Coeficiente de difusão
$K_B$	- Constante de <i>Boltzman</i>
$M_w$	- Peso molecular
MWCO	- Corte do peso molecular (Molecular Weight Cut-Off)
PDI	- Polidispersividade
PPM	- Partes por Milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RPM	- Rotações por Minuto
T	- Temperatura
RT	- Temperatura Ambiente (Room Temperature)
$T_e$	- Temperatura de Ebulição
$\eta$	- Viscosidade

## Acrónimos

CDCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio
Ce6	- Clorina e6
CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	- Diclorometano
CMC	- Concentração Micelar Crítica
CR	- Número de Contagens
DBU	- 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCC	- N,N'-diciclohexilcarbodiimida, 99%
DMAP	- 4-dimetilamino piridina
DMF	- Dimetilformamida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
Dox HCl	- Cloridrato de Doxorubicina
GPC/SEC	- Cromatografia de Permeação em Gel / Cromatografia por Exclusão de Tamanho
NaOMe/MeOH	- Solução de metóxido de sódio (30wt%) em metanol
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Sulfato de Sódio anidro
NR	- Vermelho do Nilo (Nile Red)
PBS	- Solução salina tampão de fosfato
PEG	- Poli(etileno glicol)
PEG-COOH	- PEG carboxílico
PLA	- Poli(ácido láctico)
PTFE	- Politetrafluoretileno
SegS	- Segmento Sensível ao oxigénio singuleto
TEA	- Trietilamina
TEM	- Microscopia de Transmissão Eletrónica
THF	- Tetrahydrofurano
TPP	- Tetrafenilporfirina

# Índice de Figuras

Figura 1 – Formação de micelas por self-assembly com encapsulação simultânea de um fármaco. ....	2
Figura 2 – Sequência de eventos que leva há desagregação (disassembly) da estrutura micelar devido à formação de oxigénios singuletos provocada pela irradiação de luz vermelha.....	4
Figura 3 – Síntese do PLA por polimerização por abertura de anel. (adaptado [27])	12
Figura 4 - Diferentes estereoisómeros da lactide. (adaptado [27]) .....	12
Figura 5 – Isomerização da molécula de azobenzeno. (adaptado [35]).....	16
Figura 6 – Fotodimerização da molécula de cumarina. (adaptado [35]) .....	17
Figura 7 – Fotoclivagem da molécula o-nitrobenziléster. (adaptado [35]).....	17
Figura 8 – Esquema ilustrativo da terapia fotodinâmica. O fotossensibilizador absorve o fotão e passa para o estado singuleto excitado, passando posteriormente para o estado tripleto, com mais tempo de vida. Este estado do fotossensibilizador pode interagir com a molécula de oxigénio por duas vias, tipo I e tipo II, formando espécies reativas de oxigénio (ROS) ou o oxigénio singuleto ( $^1O_2$ ), respetivamente. (adaptado [37]).....	19
Figura 9 – Estrutura química da Porfirina.....	20
Figura 10 – Ilustração esquemática do modelo de libertação do fármaco com segmentos na sua superfície clivados pelo oxigénio singuleto produzido por um fotossensibilizador irradiado e mecanismo da clivagem pelo oxigénio singuleto. (adaptado [2]).....	21
Figura 11 – a) Ilustração esquemática da formação do sistema micelar encapsulando Ce6 e Dox ( $^1O_2$ -PM-Ce6-Dox). b) Mecanismo de clivagem. (adaptado [12]) .....	22
Figura 12 – Primeira etapa. Reação de formação da forma intermédia do SegS, com a formação de um sal. ....	25
Figura 13 – Esquema da metodologia para a determinação do CMC.....	30
Figura 14 – Filtros de seringa PTFE 0,45 $\mu$ m e 1 $\mu$ m, respetivamente. ....	32

Figura 15 – Espectrofotômetro de fluorescência PerkinElmer LS 45, acoplado a um computador. ....	32
Figura 16 – Síntese do copolímero PEG-PLA através da reação química de polimerização por abertura de anel. iniciador – PEG; monômero - rac-LA.....	35
Figura 17 – Espectro $^1\text{H}$ NMR como resultado da síntese do copolímero de bloco PEG <sub>5k</sub> -PLA <sub>1k</sub> , em CDCl <sub>3</sub> . ....	36
Figura 18 – Reação de formação do segmento sensível SegS, após ligação entre o sal formado anteriormente e o composto orgânico, cis-1,2-dicloroetileno. ....	39
Figura 19 – Espectro $^1\text{H}$ RMN como resultado da síntese do segmento sensível à luz externa (SegS), em CDCl <sub>3</sub> . ....	39
Figura 20 – Reação 1: abertura de anel do anidrido succínico usando o iniciador mPEG; Reação 2: esterificação de Steglich entre o SegS e o PEG-COOH, formando o macroiniciador; Reação 3: abertura de anel da rac-LA usando PEG-COOSegSOH como macroiniciador para formar o copolímero de bloco PEG-seg-PLA.....	40
Figura 21 – Espectro $^1\text{H}$ NMR como resultado da síntese do copolímero de bloco PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> , em CDCl <sub>3</sub> .....	41
Figura 22 – Flutuação hipotética da dispersão da luz por DLS para grandes (em cima) e pequenas partículas (em baixo). Quanto maior o tamanho das partículas, maior é a intensidade da dispersão da luz. (adaptado [52]).....	44
Figura 23 - Zetasizer Nano ZS, da Malvern Panalytical. (adaptado [54]).....	45
Figura 24 – Estrutura das porfirinas usadas com fotossensibilizadores, TPP, Ce6 (em cima, da esquerda para a direita), Hidroxi e ACS-5 (em baixo, da esquerda para a direita). ....	45
Figura 25 – Resultados de DLS para as nanopartículas PEG <sub>5k</sub> -PLA <sub>1k</sub> (esquerda) e PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> (direita) como resposta à irradiação de luz vermelha. A curva a laranja representa a variação do diâmetro em função do tempo de irradiação; a curva a azul representa a variação de CR com o tempo de exposição à luz vermelha. ....	48
Figura 26 – Resultados de DLS para as nanopartículas PEG <sub>5k</sub> -PLA <sub>2k</sub> (esquerda) e PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>2k</sub> (direita) como resposta à irradiação de luz vermelha. A curva a laranja representa a variação do diâmetro em função do tempo de irradiação; a curva a azul representa a variação de CR com o tempo de exposição à luz vermelha. ....	48



Figura 27 – Gráficos da variação da taxa de count rate em função do tempo de irradiação para as nanopartículas fotossensíveis, PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>2k</sub> (esquerda) e PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> (direita). .....	49
Figura 28 – Imagens TEM das nanopartículas do tipo micelar. Agregadas formados por self-assembly, antes da irradiação, com diâmetro aproximadamente 100 nm (em cima, escala a 0,5 µm e 200 nm respetivamente), e desagregadas por ação da luz laser de 650 nm (em baixo, escala a 100 nm).....	51
Figura 29 – Resultado final dos ensaios realizados com NR para obter o CMC das nanopartículas. ....	54
Figura 30 – A) Espectro de emissão de NR ( $\lambda_{exc} = 550$ nm) para soluções com diferentes concentrações do polímero PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>2k</sub> em água. B) Intensidade de Fluorescência relativa a 580 nm em função do logaritmo da concentração (mg/mL) para o polímero. ....	54
Figura 31 – Gráfico relativo às nanopartículas do copolímero de bloco PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> com pico de emissão a 589,5nm. Curvas relativas às diferentes amostras com diferentes porções de Dox e de Ce6, evidenciadas na margem direita do gráfico.....	59
Figura 32 – Curva de calibração da Doxorubicina em DMSO (direita) como resultado dos picos de emissão de intensidade máxima a 589nm para diferentes concentrações de Dox em DMSO (esquerda). ....	59
Figura 33 – Gráficos representativos da Variação do Count Rate (kcps) e da Taxa de Count Rate (%) com o tempo de irradiação para os polímeros PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>2k</sub> (curva a azul) e PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> (curva a laranja). ....	62
Figura 34 – Gráficos representativos da emissão de fluorescência da doxorubicina encapsulada no núcleo das nanopartículas sob irradiação de $\lambda = 650$ nm. ....	63
Figura 35 – Curva de calibração da Doxorubicina em PBS (direita) como resultado dos picos de emissão de intensidade máxima a 589 nm para diferentes concentrações de Dox em PBS (esquerda). ....	64
Figura 36 – Gráfico representativo da cinética de libertação da Dox para os diferentes intervalos de tempo representados no eixo horizontal. Cada curva pertence aos diferentes tipos de micela, como descrito na legenda do gráfico. ....	65
Figura 37 – Gráfico representativo da cinética de libertação da Dox no processo de dialise, através da variação da concentração de Dox medida fora das nanopartículas	

em função tempo (minutos) para as micelas PEG<sub>5K</sub>-seg-PLA<sub>1K</sub> de composições distintas quanto ao fotossensibilizador e fármaco. ....66

# Índice de Tabelas

Tabela 1 – Nanoestruturas poliméricas em ensaios clínicos. (adaptado [19]).....	6
Tabela 2 – Quantidades para a síntese do copolímero de bloco PEG-PLA.....	25
Tabela 3 - Soluções de polímeros dissolvidos em THF.....	30
Tabela 4 – Composição das amostras para determinação do DLC e DLE. wt% - fração da massa em relação ao polímero. ....	31
Tabela 5 – Mn e PDI obtidos através da Análise SEC com recurso ao software OmniSEC 4.6.1., por intermédio de uma Calibração Universal. dn/dc medido num Refratómetro e dn/dc calculado através de uma equação da literatura [51], presente no Anexo B. ....	38
Tabela 6 – Mn e PDI obtidos através da Análise SEC com recurso ao software OmniSEC 4.6.1., por intermédio de uma Calibração Universal. dn/dc medido num Refratómetro. ....	42
Tabela 7 – Resultados da análise DLS, disponibilizados pelo software Zetasizer, para os diferentes métodos de formação de nanopartículas.....	46
Tabela 8 – Valores do índice de Polidispersividade (PDI) antes e após irradiação para os diferentes tipos de micelas quanto ao peso molecular e à presença e ausência do fragmento sensível ao oxigénio singuleto.....	50
Tabela 9 – Valores de Concentração Micelar Crítica (CMC) para as micelas do tipo PEG-PLA.....	53
Tabela 10 – Composição das amostras para determinação do DLC e DLE. ....	58
Tabela 11 – Resultados intensidade máxima a 589,5nm, que permite calcular os valores de concentração da cuvete através da reta linear de calibração da Dox em DMSO, bem como os valores de concentração da amostra. Daqui calcula-se os valores de DLC (%) e DLE (%) para as nanopartículas do copolímero de bloco PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> . ....	60
Tabela 12 – Valores percentuais da cinética de libertação da doxorrubicina para as diferentes amostras 24 horas após irradiação. (A) – PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (após irradiação); (B) – PEG <sub>5k</sub> -seg-PLA <sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (sem irradiação). ....	64

Tabela 13 – Concentração de doxorubicina libertada para as diferentes amostras 24 horas após irradiação. (A) – (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (irradiada)); (B) – (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 50 wt% + Ce6 1:1 molar (irradiada)); (C) – (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 50 wt% + Ce6 5 wt% (irradiada)). .....66

# Índice de Conteúdos

Agradecimentos .....	vii
Resumo .....	ix
Abstract .....	xi
Nomenclatura e Acrónimos .....	xiii
Nomenclatura .....	xiii
Acrónimos .....	xiv
Índice de Figuras .....	xv
Índice de Tabelas .....	xix
Índice de Conteúdos .....	xxi
1 Introdução .....	1
2 Estado de Arte .....	5
2.1 Nanoestruturas como Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos .....	5
2.1.1 Tempo de permanência .....	6
2.1.2 Tamanho .....	6
2.1.3 Método de Preparação .....	7
2.1.4 Comprimento e peso molecular dos segmentos .....	8
2.1.5 Encapsulação e Estabilidade .....	8
2.2 Copolímeros à base de poliésteres para Sistemas de Libertação Controlada de fármacos .....	11
2.2.1 Copolímero de bloco – Peg-PLA .....	11
2.3 Polímeros Fotossensíveis .....	15
2.3.1 Fotossensibilizadores .....	18
2.4 Sistema de libertação de fármacos por ativação do fotossensibilizador .....	21

3	Materiais e Métodos .....	23
3.1	Materiais.....	23
3.2	Métodos e Procedimentos .....	24
3.2.1	Síntese dos copolímeros de bloco (PEG-PLA) .....	24
3.2.2	Síntese do fragmento sensível ao oxigénio singuleto – SegS .....	25
3.2.3	Reação de ligação entre o copolímero de bloco e o SegS .....	26
3.2.4	Caracterização .....	27
3.2.4.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	27
3.2.4.2	Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC/GPC).....	27
3.2.5	Formação das nanopartículas e Concentração Micelar Crítica ....	28
3.2.5.1	Formação de nanopartículas.....	28
3.2.5.2	Formação de nanopartículas.....	29
3.2.6	Determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas .. .....	31
3.2.7	Estudo da libertação de material encapsulado após incidência de luz vermelha .....	33
4	Resultados e Discussão.....	35
4.1	Síntese e Caracterização dos polímeros .....	35
4.1.1	PEG-PLA – síntese e caracterização .....	35
4.1.2	SegS – Síntese do Segmento Sensível .....	38
4.1.3	PEG-seg-PLA – síntese e caracterização .....	40
4.2	Preparação e Caracterização das nanopartículas .....	43
4.2.1	Métodos de Preparação de nanopartículas .....	43
4.2.2	Comportamento das nanopartículas à luz.....	47
4.3	Determinação do CMC micelar.....	53
4.4	Determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas ....	57
4.5	Estudo da libertação do fármaco pelas nanopartículas.....	61
5	Conclusões e Trabalho Futuro .....	67

6	Referências Bibliográficas.....	69
	Anexos .....	A
	Anexo A: Síntese do polímero PEG-PLA .....	A
	Anexo B: Determinação do DN/DC .....	B
	Anexo C: Síntese do polímero PEG-seg-PLA.....	C
	Anexo D: Determinação do CMC micelar.....	D
	Anexo E: Determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas .....	E





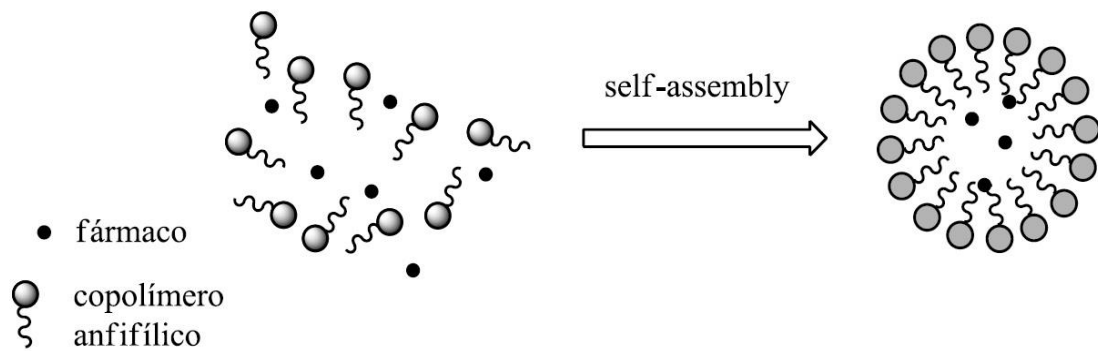
# 1 Introdução

Atualmente, o cancro é das doenças mais mortíferas para o ser humano. Estima-se que a partir de 2025 surjam 19.3 milhões novos casos oncológicos por ano [1].

De um modo geral, o combate, no que concerne à terapia, passa pela imunoterapia, quimioterapia, radioterapia ou cirurgia. Porém, estes mesmos métodos terapêuticos acarretam consequências negativas para o organismo: a alta toxicidade, a falta de solubilidade aquosa, a não especificidade inerente à distribuição, assim como a falta de especificidade na entrega do fármaco [1].

Como resposta a este problema, que incide também nos tecidos circundantes ao local do cancro, tem sido explorado os sistemas de libertação controlada de fármacos à base de nanopartículas poliméricas. Estes sistemas potenciam o aumento da solubilidade do fármaco, com proteção *in vivo* perante as características dos fluidos corporais, a simplicidade na funcionalização do transporte do fármaco, assim como promovem índices de libertação previsíveis e controláveis. [2] Outra vantagem, relacionada com a solubilidade que estes sistemas conferem, está associada há possibilidade dos fármacos hidrofóbicos, tipicamente tumorais, atravessarem o meio aquoso do corpo humano [3]. Porém, a utilização de nanopartículas para a fins terapêuticos ainda não alcançou todo o seu potencial sobretudo pela pouca capacidade de aportar fármacos de maiores dimensões [4].

Quanto ao processo de encapsulação, a técnica de *self-assembly*, representada na Figura 1, é uma das que melhores resultados reúnem.



*Figura 1 – Formação de micelas por self-assembly com encapsulação simultânea de um fármaco.*

O objetivo desta técnica passa por formar uma estrutura micelar com o tamanho de nanopartículas. Para o copolímero de bloco se organizar dessa forma é necessário o processo ocorrer num meio em que o solvente proporcione este comportamento dos polímeros. Assim, a micela forma-se caso um dos segmentos seja solúvel – componente hidrofílica – e constitua a “carapaça” e os segmentos insolúveis – componente hidrofóbica – sejam o núcleo da mesma. A Figura 1 apresenta a encapsulação de um fármaco que, sendo hidrofóbico, é armazenado no interior da estrutura micelar.

O sistema de entrega de fármacos com estrutura micelar, além de ter que apresentar eficiência na encapsulação, necessita de outras características para ser considerado fisiologicamente viável para o efeito. Destacam-se a biodegradabilidade e a biocompatibilidade, que dependem da natureza estrutural das micelas e dos fluidos biológicos onde se inserem [4], [5]. No entanto, estas características são condição necessária mas não suficiente para garantir o sucesso destes sistemas. Não só a estrutura micelar tem que se manter estável durante a preparação e administração da mesma, como também deve promover a entrega do fármaco no local de interesse. Surge daí a necessidade de existirem estímulos externos que desencadeiem a desagregação das micelas e, conseqüentemente, a libertação específica.

Alguns desses estímulos ambientais, como a concentração de uma molécula biológica específica, a mudança de pH, o potencial redox, a temperatura e a radiação têm sido testados em várias investigações [2], [6]. No caso das micelas que contêm polímeros que mudam a sua estrutura após protonação/desprotonação, o interesse

## 1. Introdução

---

deve-se à diferença de concentração de hidrogénio entre os tecidos tumorais e os tecidos circundantes – o pH intracelular dos tumores sólidos varia entre 7.0-7.2, sendo o extracelular mais ácido [7]. No entanto, a biocompatibilidade polimérica é mais difícil de ser alcançada nestas condições. Para as variações térmicas, a diferença na temperatura entre os dois tecidos já não é tão significativa e torna-se necessário ter zonas com temperatura altas o suficiente para provocar a destruição da micela, mas que não sejam demasiado altas que levem à destruição das células vizinhas. Desta forma, a libertação de fármacos como resposta a uma alteração térmica é complexa.

De todas as alternativas, a irradiação com a luz como fator externo é considerada como um dos métodos mais promissores. Desde logo é possível localizá-la no espaço e no tempo. Além disso, é não invasiva, e não recorre a nenhum reagente. Os parâmetros a avaliar por este estímulo, como a intensidade e o comprimento de onda, são facilmente ajustáveis. No caso dos polímeros, o recurso a apenas um feixe de luz é capaz de viabilizar o a desagregação das nanopartículas (*disassembly*) [8]. O facto de alcançar qualquer parte do corpo humano, devido ao desenvolvimento de fibras óticas, é uma vantagem associada à luz como estímulo externo.

Os sistemas sensíveis à irradiação possuem funcionalidades químicas específicas que respondem fotoquimicamente quando expostos a radiação UV. Contudo, a radiação UV não tem grande poder de penetração, para além de ser prejudicial ao organismo [2], [8]. Quanto à luz na zona do visível, existe já uma gama alargada de comprimentos de onda que são inócuos para o organismo. Desta gama, destaca-se a luz de longo comprimento de onda, como é o exemplo da luz vermelha e próxima do infravermelho, onde a energia é baixa o suficiente para não interagir negativamente com as células circundantes. Nesta gama do visível o alto poder de penetração tecidual permite a aplicação biológica da mesma. [9], [10]

A maior parte dos trabalhos até então desenvolvidos apresentam comprimentos de onda na gama dos 300 nm, que implica uma energia de radiação elevada e capaz de danificar irreversivelmente as estruturas celulares, para além do baixo poder de penetração. Outros trabalhos focam-se no uso de comprimentos de onda na zona do vermelho, mas com dupla absorção de fotões, o que requer tecnologia ainda sem aplicação prática [11].

## 1. Introdução

Com estas premissas, o objetivo passa pelo desenvolvimento de um sistema de libertação baseado na luz como estímulo externo de comprimento de onda na zona do vermelho que corresponde à zona de maior poder de penetração tecidual e menos energética. Tal sistema passará pelo desenvolvimento de estruturas micelares que, após encapsularem um fármaco, terão a capacidade de reagir a um feixe de comprimento de onda elevado (superior a 600 nm) que leva à rápida libertação do conteúdo somente no local irradiado.

Assim são utilizados blocos anfifílicos que se organizam em estruturas micelares por *self-assembly* e que encapsulam um fármaco, a doxorubicina. Os polímeros de bloco encontram-se ligados por um segmento sensível (SegS) ao oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ). Este tipo de oxigénio excitado deriva do oxigénio no seu estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ) que se forma quando um fotossensibilizador é iluminado. Na presença deste oxigénio singuleto, o segmento quebra, separa os dois polímeros, um hidrofóbico e o outro hidrofílico, destruindo assim a micela. O mecanismo está esquematizado na Figura 2.

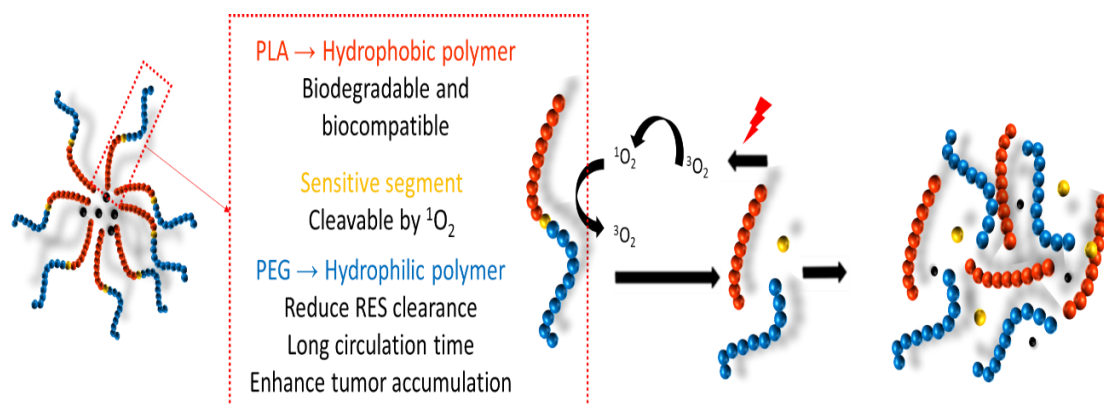


Figura 2 – Sequência de eventos que leva à desagregação (disassembly) da estrutura micelar devido à formação de oxigénios singuletos provocada pela irradiação de luz vermelha.

Cronologicamente, o primeiro passo passou pela preparação de copolímeros de bloco com diferentes pesos moleculares unidos pelo fragmento sensível ao oxigénio singuleto. Depois surgiu a análise da capacidade de *self-assembly* dos copolímeros preparados. Foi determinada a capacidade de encapsulação das estruturas micelares. E, por fim, realizaram-se os estudos de libertação do material encapsulado, o fármaco Dox, após incidência de luz vermelha de comprimento de onda 650 nm.

## 2 Estado de Arte

### 2.1 Nanoestruturas como Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos

Com o objetivo de diminuir os efeitos adversos dos fármacos nos tecidos vizinhos ao local de interesse e para aumentar a eficiência na sua ação, inúmeras plataformas de transporte à base de nanopartículas têm sido desenvolvidas. Desde lipossomas, micelas poliméricas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas, as micelas, ao proporcionarem o aumento da solubilidade dos fármacos na circulação sanguínea e a melhoria na encapsulação, surgem como sistemas de libertação controlada de fármacos mais promissores [12], [13].

Em termos estruturais, as micelas poliméricas, como copolímeros de bloco anfifílicos, organizam-se por *self-assembly* em meios aquosos. A conformação micelar pressupõe a formação de um núcleo hidrofóbico revestido por uma camada polimérica hidrofílica que permite o contacto com o meio aquoso. O fenómeno de auto-organização dos copolímeros de bloco anfifílicos só ocorre acima de uma dada concentração no meio aquoso, conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC) [14]. Fisiologicamente, o núcleo hidrofóbico prolonga a disponibilidade biológica do fármaco encapsulado, importante para aumentar a eficácia na encapsulação, transporte e libertação do mesmo. Já o revestimento hidrofílico melhora a dispersividade biológica numa solução aquosa com o controlo do percurso realizado no organismo humano e, portanto, o comportamento farmacocinético [15].

No que concerne às nanoestruturas poliméricas já estudadas que aumentaram a eficiência dos fármacos anticancerígenos comparativamente, destacam-se o poli(etilenoglicol)-ácido poli(lático) (PEG-PLA) que encapsula o docetaxel, o PEG-PAE que encapsula a doxorubicina e a camptotecina, e o PEG-PCL-PEG que encapsula o paclitaxel [16]. O denominador comum nas micelas referidas relaciona-se com as características que devem apresentar para potenciar o sistema de libertação controlada de fármacos.

### 2.1.1 Tempo de permanência

O tempo de permanência do sistema de liberação controlada de fármacos no organismo humano depende das interações que o mesmo realiza durante a sua circulação. Uma das interações a ter em conta é feita com o sistema reticuloendotelial (SER). Este sistema orgânico, constituído por um conjunto de células com características reticulares e endoteliais, é dotado de capacidade fagocitária. Além disso, as proteínas sanguíneas, ao ligarem-se à superfície das partículas em circulação, promovem a absorção pelo SER. É aqui que emerge a importância do PEG. Os sistemas de transporte que apresentam PEG na sua superfície possuem um tempo de permanência mais elevado dada a menor interação proteica que impede a absorção pelo SER. Devido a este fator, aliado à não toxicidade e não imunogenicidade do polímero, há já uma grande quantidade de conjugados de PEG-fármaco a serem comercializados ou numa fase adiantada de avaliação clínica, como representado na Tabela 1 [17]. A diminuição na absorção proteica e do SER é facilitada ainda pelo aumento da concentração de PEG e da densidade da cadeia hidrofílica que prolonga o tempo de circulação *in vivo* [18].

Tabela 1 – Nanoestruturas poliméricas em ensaios clínicos. (adaptado [19])

<b>Produto</b>	<b>Polímeros</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>DLC (%)</b>
<i>Genexol®-PM</i>	mPEG-PDLLA	Paclitaxel	<50	16,7
<i>NK105</i>	PEG-P(Asp)	Paclitaxel	85	23
<i>NK911</i>	PEG-b-P(Asp)	Doxorrubicina	40	17
<i>NC-6004</i>	PEG-PGlu	Cisplatina	30	30
<i>NC-4016</i>	PEG-b-PGlu	Oxaliplatina	30	30

### 2.1.2 Tamanho

O tamanho da nanopartícula é uma característica importante que interfere na permeabilidade das veias sanguíneas cancerígenas e na presença do fármaco no local do tumor. Regra geral, o diâmetro das nanopartículas poliméricas varia entre 10-200 nm [20]. Neste intervalo, estudos concluíram que os agregados de 100 nm têm maior

capacidade de evitar a excreção renal e absorção pelo SER, o que aumenta o tempo de circulação dos mesmos [21]. Porém, este diâmetro não é suficiente para a penetração no tumor. Ao contrário dos tumores com grande permeabilidade que não apresentam restrições entre 30-100 nm, os de menor permeabilidade permitem a penetração a nanopartículas menores que 50 nm [17].

Esta característica é influenciada por várias propriedades da nanopartícula. Com o aumento do tamanho do polímero, aumenta também o tamanho da nanopartícula. Também o aumento da quantidade de fármaco encapsulado provoca um crescimento em tamanho da nanoestrutura.

### 2.1.3 Método de Preparação

O método de preparação das nanopartículas depende da solubilidade do polímero no solvente e do tipo de fármaco, ou seja, da sua natureza hidrofóbica ou hidrofílica. A solubilidade do copolímero dependerá do peso molecular de cada segmento que o constitui. Caso a componente hidrofílica do copolímero tenha maior peso molecular, a nanopartícula será mais pequena e mais facilmente dispersa no meio aquoso. Se, pelo contrário, estiver com maior peso molecular o bloco hidrofóbico, o copolímero será mais insolúvel em água [14].

Assim sendo, são vários os métodos que levam ao *self-assembly* das nanopartículas. Desde logo, a dissolução direta é o método utilizado para polímeros solúveis em água. Neste método, o polímero e o fármaco são adicionados ao solvente aquoso em agitação. Em determinadas situações, o calor é empregue de forma a aquecer a solução, ocorrendo a formação da nanopartícula de estrutura micelar por desidratação do segmento hidrofóbico [22].

Para polímeros com menor solubilidade em soluções aquosas, os métodos de preparação mais usados são a evaporação de solvente e o método de diálise. Na evaporação do solvente, o fármaco e o polímero são dissolvidos num mesmo solvente adequado para ambos. Devido a uma pressão reduzida imposta durante a evaporação do solvente, forma-se uma película fina que contém o polímero e o fármaco. A nanoestrutura micelar forma-se por reidratação numa solução aquosa sob agitação [14], [22]. Já no método de diálise, o polímero e o fármaco são dissolvidos num solvente orgânico solúvel em água, como é o exemplo do DMF, DMSO e THF, e

posteriormente, é adicionada água à solução sob agitação. Seguidamente, ocorre o processo de diálise onde, na presença de um dado volume de água, o solvente em solução é removido por existir menor concentração do solvente no meio circundante. A diálise é o método mais utilizado para a encapsulação da Dox [14].

### **2.1.4 Comprimento e peso molecular dos segmentos**

O peso molecular e a quantidade de PEG que constitui a parte hidrofílica da nanopartícula influencia a estabilidade e a liberação do fármaco. A variação na quantidade de PEG permite controlar a taxa de biodegradação do copolímero [23]. Também a estabilidade e a natureza hidrofóbica do PLA influenciam a encapsulação e liberação do fármaco. Em estudos realizados, concluiu-se que a eficiência na encapsulação aumenta com o aumento do comprimento da cadeia de PLA. Já a taxa de liberação do fármaco aumenta para uma cadeia de PLA mais reduzida, considerando que o peso molecular de PEG é mais baixo [24]. Este aumento da taxa de liberação deve-se à menor interação entre os segmentos hidrofóbicos que provoca ainda um aumento do tamanho da nanopartícula.

A morfologia das nanopartículas de estrutura micelar formadas por copolímeros anfifílicos também varia de acordo com o comprimento das cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas. A redução do comprimento do bloco hidrofílico diminui a repulsão entre o núcleo e a camada exterior da nanopartícula. Desta forma, ocorre um maior empacotamento de copolímeros, dando um formato mais cilíndrico à nanopartícula. Com o aumento do bloco hidrofóbico, a nanopartícula adquire uma morfologia semelhante a uma bicamada. Caso os segmentos apresentem um comprimento aproximadamente idêntico, a nanopartícula assumirá uma forma esférica [22].

### **2.1.5 Encapsulação e Estabilidade**

A eficiência na encapsulação do fármaco está intrinsecamente relacionada com a interação estabelecida entre o mesmo e o núcleo da nanopartícula. Não só a natureza do polímero do núcleo da nanopartícula, como o comprimento do bloco hidrofóbico e o método de preparação afetam a encapsulação. Além disso, a ligação física entre o segmento hidrofóbico e o fármaco, que pode ser por intermédio de



## 2.1. Nanoestruturas como Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

---

ligações covalentes ou por interações físicas, determina o grau de compatibilidade entre os componentes. Segundo estudos realizados por Nasongkla *et al.*, em núcleos de micelas cuja composição possui poli(D,L-lactide), a liberação da Dox através da matriz da micela ocorreu de forma mais acelerada. [25]

A estabilidade termodinâmica das nanopartículas poliméricas é um parâmetro importante para garantir a integridade física das mesmas. Para assegurar essa estabilidade, desde que entram na circulação sanguínea até que alcançam o local de interesse e se desagregam, as nanopartículas poliméricas apresentam baixos valores de Concentração Micelar Crítica (CMC). Considerando que o CMC define a estabilidade termodinâmica das estruturas micelares, a baixa concentração dos copolímeros anfifílicos determina a capacidade de diluição na corrente sanguínea. Assim, e segundo a literatura, para o copolímero de bloco PEG-PLA, a estabilidade no processo de diluição é facilitada para valores de CMC entre 3-6  $\mu\text{g/mL}$ . Além do mais, verifica-se que o aumento da cadeia do polímero hidrofóbico provoca um decréscimo no CMC [24]. Quanto à cadeia hidrofílica, apesar de ser importante na estabilidade, por permitir a circulação em fluidos aquosos, o seu aumento não influencia o valor de CMC. Conclui-se que, para baixos valores de CMC, a estabilidade das nanopartículas poliméricas é mais facilmente assegurada [13].



## 2.2 Copolímeros à base de poliésteres para Sistemas de Liberação Controlada de fármacos

A biocompatibilidade, assim como a não toxicidade dos produtos resultantes da sua degradação, fazem da poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), do poli(ácido glicólico) (PGA) e do poli(ácido láctico) (PLA) os poliésteres mais utilizados para formarem sistemas de liberação controlada de fármacos. A degradação dos polímeros referidos ocorre por hidrólise das ligações éster originando produtos não tóxicos para o organismo, que são eliminados através da urina ou da atividade celular [15], [26]. As micelas que apresentam poliésteres na sua constituição, normalmente contêm o poli(etileno glicol) (PEG) que confere o carácter anfifílico à estrutura, destacando-se os copolímeros de bloco, PEG-PLGA, PEG-PCL e PEG-PLA.

### 2.2.1 Copolímero de bloco – PEG-PLA

O PLA tem sido extensamente estudado como poliéster para a encapsulação e liberação de fármacos e é já comercializado como constituinte de suturas cirúrgicas e de microesferas para liberação de fármacos [4]. A sua utilidade nesta área biomédica deve-se, sobretudo, à biocompatibilidade, biodegradabilidade e ao seu baixo custo de produção [26]. Quanto ao processo de formação do polímero, o PLA é obtido a partir do ácido láctico, que é um ácido orgânico presente na Natureza. O ácido láctico pode ser produzido pela formação de açúcares provenientes de recursos renováveis, como a cana-de-açúcar. Assim, o PLA pode ser produzido e usado segundo um ciclo ecologicamente amigo do ambiente [26]. A Figura 3 mostra a reação de síntese do PLA por abertura de anel do ácido láctico.

## 2.2. Copolímeros à base de poliésteres para Sistemas de Liberação Controlada de fármacos

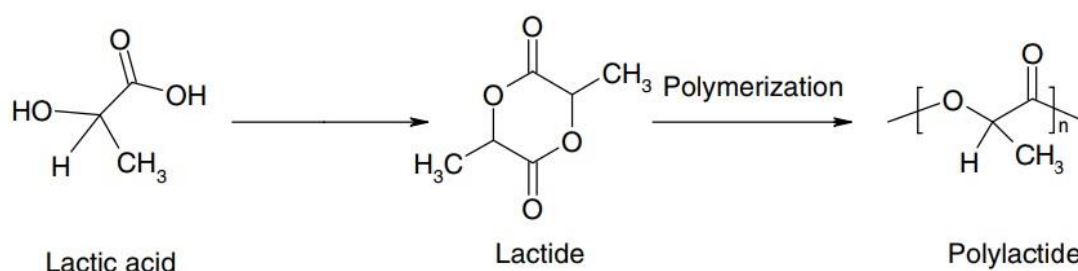


Figura 3 – Síntese do PLA por polimerização por abertura de anel. (adaptado [27])

Além disso, o ácido láctico pode ser produzido pela síntese química através da hidrólise da lactonitrila por ácidos fortes, levando à formação de uma mistura racêmica de ácidos D-ácido láctico e L-ácido láctico [26]. O ácido láctido apresenta dois isômeros – L-LA e D-LA – devido à sua quiralidade. Tendo em consideração que os dois são usados para a síntese da lactide então existem três estereoisômeros da mesma, evidenciados na Figura 4.

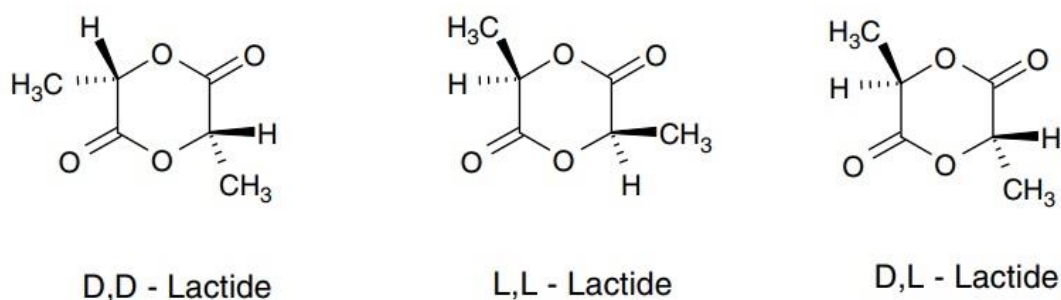


Figura 4 - Diferentes estereoisômeros da lactide. (adaptado [27])

Estas características estereoquímicas do PLA influenciam ainda a biodegradação dos polímeros, uma vez que o poli(L-lactide) (PLLA) apresenta uma degradação *in vitro* mais lenta que o poli(D,L-lactide) [28]. A biodegradação também é afetada pelo peso molecular do PLA, dado que a sua diminuição aumenta a biodegradabilidade [27].

Devido à biocompatibilidade e estabilidade, os copolímeros à base de PLA e PEG têm tido especial destaque no estudo dos sistemas de liberação controlada de fármacos. Exemplo disso foi o lançamento, em 2007, das micelas de PEG-*b*-PLA, com o nome GENEXOL-PM para o transporte de paclitaxel [15]. Neste copolímero de bloco anfílico, maioritariamente polimerizado por abertura do anel da lactide, a

## 2.2. Copolímeros à base de poliésteres para Sistemas de Liberação Controlada de fármacos

---

quantidade de polímeros influencia as suas características. Em relação ao PLA, quanto maior o seu comprimento, maior é a encapsulação do fármaco e menor será a sua libertação, dada à maior interação entre ambos. No caso em que o peso molecular do PLA é menor num copolímero de bloco, PEG-PLA, o tamanho da partícula em causa não sofre grandes alterações durante a encapsulação. Se o peso molecular do PLA fosse elevado, o núcleo seria mais compacto e, com a encapsulação do fármaco, o tamanho iria aumentar inevitavelmente. Como o peso molecular é reduzido, já existe um espaço suficiente para a encapsulação, sem que o tamanho seja alterado [13].

Já a presença de maior quantidade de PEG provoca um aumento na libertação do fármaco. A estabilidade é influenciada pelo tamanho das partículas, aumentando com a diminuição do tamanho das mesmas. Também a incorporação do fármaco provoca oscilações na estabilidade, uma vez que vai alterar o equilíbrio que existe entre a componente hidrofílica e hidrofóbica. Assim, devido às interações entre o núcleo da micela e o fármaco, quanto menor a encapsulação maior é a estabilidade do sistema [13].

Em estudos realizados por Jelonek *et al.*, onde se sintetizou o copolímero de bloco PEG-PLA, por abertura de anel da lactide com o metoxipoli(etileno glicol) (mPEG) e o lactato de zinco como catalisador, verificou-se uma diminuição do valor de CMC com o aumento do tamanho do bloco de PLA [24]. Segundo Li *et al.*, o valor de CMC também diminui com o aumento do peso molecular do copolímero de bloco, PEG-PLA [29].

Todos os estudos relacionados com os copolímeros de bloco à base de poliésteres com o PEG como iniciador e até então realizados utilizavam catalisadores metálicos, altas temperaturas e pressões reduzidas como condições para a polimerização por abertura de anel. Contudo, é necessário alterar estas condições de forma a permitir a encapsulação nas proporções mais sensíveis do polímero. Em 2011 foi publicado o trabalho de Qian *et al.*, onde, partindo do catalisador 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) e do PEG como macroiniciador, se realizou uma polimerização por abertura de anel de uma mistura racémica de D e L-lactide. O processo permitiu a obtenção de um copolímero de bloco PEG-PLA através de uma polimerização que ocorreu a uma temperatura ambiente (rt), com um controlo rigoroso da distribuição do peso molecular [30].

## 2.2. Copolímeros à base de poliésteres para Sistemas de Liberação Controlada de fármacos

---

## 2.3 Polímeros Fotossensíveis

A eficácia dos sistemas de liberação controlada de fármacos no local de interesse é assegurada por polímeros capazes de reagir estruturalmente a alterações no ambiente circundante. Essas alterações podem ser desencadeadas por estímulos de natureza química ou física, como é o caso do pH, da temperatura, das condições oxidativas/redutoras ou da luz incidente. Como mencionado anteriormente, os polímeros fotossensíveis são mais eficientes, dada a sua rapidez de resposta, ação não invasiva e alta precisão. Além disso, parâmetros como a intensidade, o comprimento de onda e o tempo de irradiação, são facilmente manipuláveis [8]. Com estas premissas, é possível o desenvolvimento de sistemas poliméricos capazes de se desagregar por *self-disassembly* por ação da luz, controlando a encapsulação e liberação de fármacos [31].

Estruturalmente, os polímeros que respondem a estímulos luminosos são macromoléculas que alteram as suas propriedades quando irradiados por uma luz de comprimento de onda específico. Assim acontece, uma vez que na cadeia lateral ou no esqueleto destes polímeros estão presentes grupos funcionais ou cromóforos que são geralmente encapsulados ou conjugados com a superfície dos mesmos. Na presença de luz, estes têm como função capturar a energia da mesma e convertê-la num sinal químico. Da foto-reação resultam transformações estruturais dos grupos funcionais fotossensíveis, que permite a ocorrência de fenômenos como o *self-assembly* e o *disassembly* [32], [33].

Desta forma, são muitos os grupos funcionais fotossensíveis que modificam a estrutura dos polímeros de forma a proporcionar a formação e desagregação de nanopartículas micelares controlada pela luz, dos quais se destacam *o*-nitrobenzilo, espiropirano e azobenzeno [34].

Quanto às reações que podem ser induzidas pela luz, surgem três tipos: fotoisomerização, fotodimerização e fotoclivagem. Algumas reações são reversíveis e podem ser repetidas várias vezes, onde a reação inversa ocorre com uma irradiação de comprimento de onda diferente ou com um estímulo distinto, como pH ou temperatura [35].

## 2.3 Polímeros Fotossensíveis

A fotoisomerização é um processo onde ocorre uma mudança em torno de uma ligação específica que causa uma alteração na conformação da cadeia. A isomerização de ligações duplas da forma *cis* para *trans*, é um exemplo deste processo, nomeadamente em azobenzenos que sofrem rápidas alterações na sua polaridade e forma geométrica, como mostra a Figura 5. Além disso, a estrutura com forma planar *trans* é mais estável e não possui momento dipolar, já a forma não planar *cis* é menos estável e mais polar. Assim, um polímero com grupos azobenzenos na forma *trans* que tem a capacidade de formar micelas, após irradiação de luz ultravioleta (UV) (300-400 nm), vai sofrer uma fotoisomerização para a forma *cis* que provoca o fenómeno de *disassembly*. Para além da luz UV, também a luz visível na gama 400-480 nm e o calor provocam reações de isomerização na molécula de azobenzeno [35].

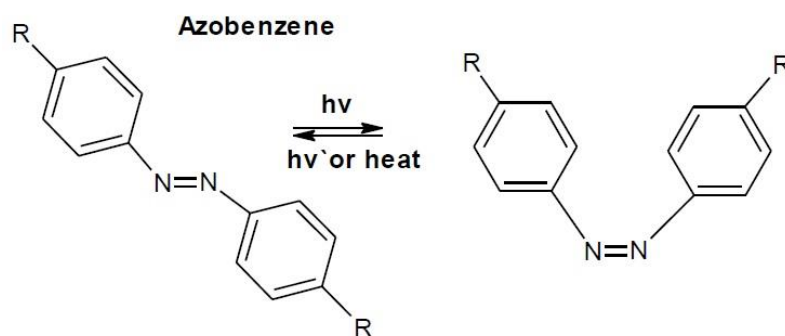


Figura 5 – Isomerização da molécula de azobenzeno. (adaptado [35])

A fotodimerização é um processo foto reversível, onde a luz incidente provoca uma reticulação com as moléculas vizinhas por intermédio do estabelecimento de novas ligações C-C. A cumarina é das moléculas onde este processo pode ocorrer [35]. Tendo em conta que a reação é rápida, eficiente e que permite o controlo da estrutura, a cumarina tem características que potenciam a formação de copolímeros bloco anfifílicos. A Figura 6 apresenta o processo de fotodimerização da cumarina.



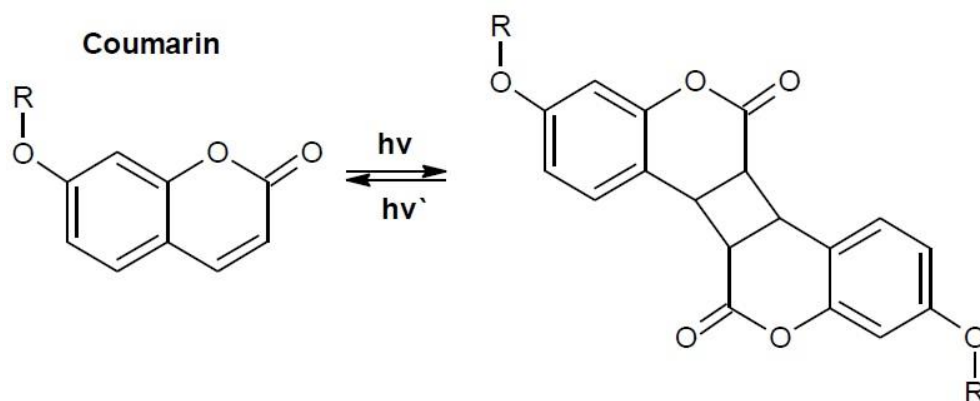


Figura 6 – Fotodimerização da molécula de cumarina. (adaptado [35])

A fotoclivagem corresponde ao processo de quebra de ligação química no momento em que o grupo funcional fotosensível é irradiado. Um exemplo desse grupo é o *o*-nitrobenzilo. O ácido carboxílico é um produto da degradação do *o*-nitrobenzilo e o grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ) é reduzido a um composto nitroso (nitrosobenzaldeído), que pode potencializar a toxicidade *in vivo* dada a sua reatividade perante biomoléculas do organismo [35]. A Figura 7 apresenta a fotoclivagem da molécula *o*-nitrobenziléster.

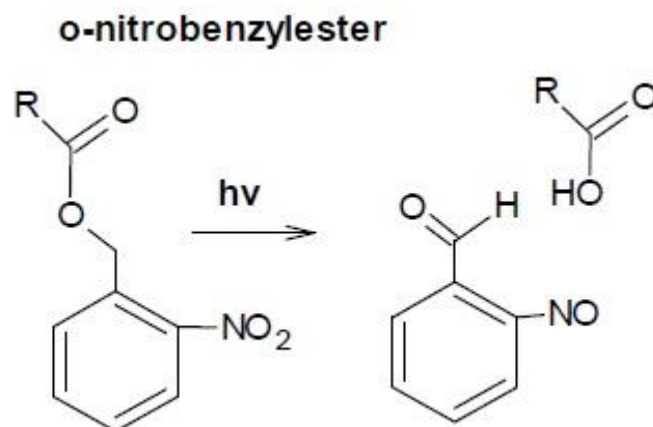


Figura 7 – Fotoclivagem da molécula *o*-nitrobenziléster. (adaptado [35])

Das três reações induzidas pela luz, os ensaios realizados até então apresentavam baixo comprimento de onda da radiação como fator comum. Para além do baixo poder de penetração tecidual, o uso de radiação de baixo comprimento de onda é prejudicial às células saudáveis. Assim, a radiação na zona do visível ou próximo do infravermelho, sendo de natureza inócua, apresentam-se como mais

interessantes na aplicação biomédica.

Como forma de contornar este problema do baixo comprimento de onda e consequente da elevada energia necessária para que ocorra a reação molecular induzida pela luz, surgiu a tecnologia de excitação de dois fótons. Nesta tecnologia, metade da energia que é necessária para excitar a molécula está contida em cada um dos dois fótons, permitindo o recurso a fótons de comprimento de onda menos nocivos para as células saudáveis. Porém, a probabilidade de absorção simultânea dos dois fótons é baixa, sendo crucial um fluxo elevado de fótons excitados. Como alternativa para induzir a libertação de fármacos através da destabilização estrutural das micelas, surgiram os fotossensibilizadores.

### 2.3.1 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores são usados maioritariamente na terapia fotodinâmica, devido à produção de espécies reativas desencadeada pela irradiação destes compostos. Esta terapêutica depende da administração de um fotossensibilizador que apresenta efeito farmacológico após irradiação. No processo fotodinâmico, as moléculas no estado excitado de energia reagem com a molécula de oxigénio, gerando espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) que induzem a necrose ou apoptose das células tumorais [12]. Para tal, os fotossensibilizadores absorvem a luz num determinado comprimento de onda – correspondente à zona de absorção de energia mais baixa – e transforma-a em energia útil, permitindo a ocorrência de reações e consequentemente alterações químicas no local onde se encontram. Desta forma, o fotossensibilizador é posicionado onde a libertação das espécies reativas possa danificar as estruturas do tecido cancerígeno [36]. A terapia fotodinâmica apresenta pouco efeitos secundários, não só porque o efeito citotóxico ocorre apenas no local de ativação da luz, mas também devido à seletividade desta terapia salvaguardada pela acumulação dos fotossensibilizadores exclusivamente nas células tumorais.

Relativamente ao mecanismo fotoquímico, o fotossensibilizador, sob iluminação, é excitado do seu estado fundamental ( $S_0$ ) para o primeiro estado excitado singlete ( $S_1$ ), procedido pela conversão no estado excitado tripleto ( $T_1$ ) via cruzamento de intersistema. O tempo de vida mais longo do estado tripleto permite a

## 2.3 Polímeros Fotossensíveis

interação do fotossensibilizador excitado com as moléculas circundantes, sendo que a formação das espécies citotóxicas durante a terapia ocorre neste estado excitado [36].

O estado tripleto excitado pode reagir de duas formas, para formar as espécies reativas de oxigénio: segundo o mecanismo Tipo I ou Tipo II. O mecanismo Tipo I envolve a abstração de átomos de hidrogénio ou reações de transferência de eletrões entre o estado excitado e o substrato que geralmente é biológico, como um solvente ou outro fotossensibilizador, produzindo radicais livres ou espécies de radicais iónicas. Estes radicais livres são muito reativos, interagindo com a molécula de oxigénio para formar espécies de oxigénio reativas (ROS), como radicais de aniões superóxido, radicais hidroxilo ou radicais peróxido de hidrogénio, e podem danificar irreversivelmente os tecidos biológicos [36].

No mecanismo Tipo II, o estado tripleto excitado do fotossensibilizador transfere energia para o oxigénio molecular no estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o primeiro estado excitado do oxigénio ( $^1\text{O}_2$  – oxigénio singuleto). Este mecanismo ocorre predominantemente na terapia fotodinâmica, sendo o oxigénio singuleto o agente citotóxico primário responsável pelos efeitos biológicos. A Figura 8 esquematiza a terapia fotodinâmica.

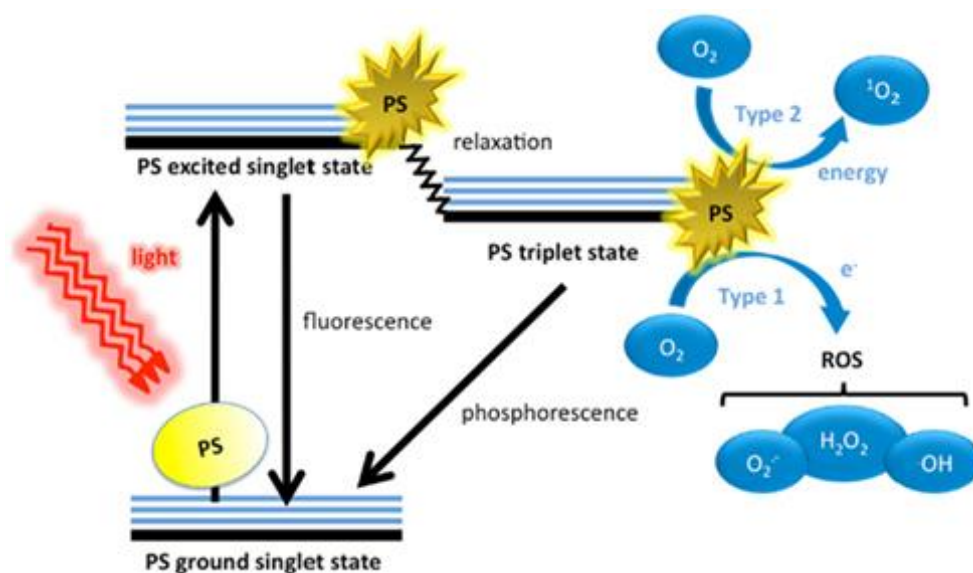
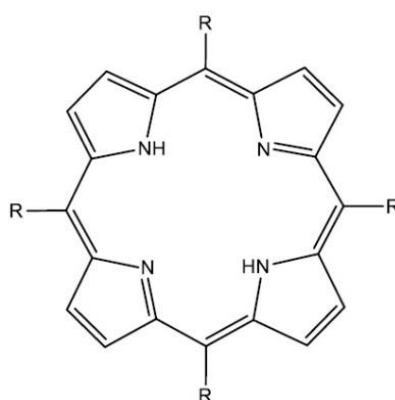


Figura 8 – Esquema ilustrativo da terapia fotodinâmica. O fotossensibilizador absorve o fóton e passa para o estado singuleto excitado, passando posteriormente para o estado tripleto, com mais tempo de vida. Este estado do fotossensibilizador pode interagir com a molécula de oxigénio por duas vias, tipo I e tipo II, formando espécies reativas de oxigénio (ROS) ou o oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ), respetivamente. (adaptado [37])

## 2.3 Polímeros Fotossensíveis

Em ambientes mais polares ou com menor concentração de oxigênio, o Tipo I torna-se mais importante. Os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, sendo que o efeito global de ambos é a destruição do tumor, provocando danos oxidativos no interior das células-alvo [36].

Dentro dos tipos de fotossensibilizadores, destacam-se as porfirinas. Estas podem ser de origem natural ou sintética, sendo em geral compostos biocompatíveis. Porém, sendo altamente hidrofóbicas, a sua aplicação biomédica é restrita. Quanto à composição, as porfirinas são uma classe de compostos aromáticos heterocíclicos [38]. A sua estrutura básica está representada na Figura 9.



*Figura 9 – Estrutura química da Porphirina.*

Para as porfirinas, os comprimentos de onda mais altos de absorção rondam os 600 nm.

Outros exemplos de fotossensibilizadores que não sejam porfirinas são: a hipericina, antraquinona, fenotiazina ou o azul de metileno [39].

## 2.4 Sistema de libertação de fármacos por ativação do fotossensibilizador

O desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos com o recurso a fotossensibilizadores não tem tido ainda grande evidência nesta área da biomedicina, em detrimento de nanopartículas poliméricas que são formadas com outras moléculas que respondem à luz. No entanto, é possível libertar moléculas encapsuladas em nanopartículas onde, ligado ao copolímero de bloco, está presente um segmento reativo capaz de interagir com o oxigénio singuleto produzido por um fotossensibilizador após irradiação num dado comprimento de onda.

Num ensaio realizado por Lee *et al.* foi desenvolvido um sistema constituído por nanopartículas de sílica mesoporosa com um fotossensibilizador, com máxima absorvância entre 600-700 nm, e um ligante sensível ao oxigénio singuleto. O ligante foi clivado pelo oxigénio singuleto, permitindo a libertação do fármaco, o que demonstrou a eficácia do sistema para objetivo estipulado [2]. A Figura 10 mostra o processo de clivagem do ligante por ação do fotossensibilizador.

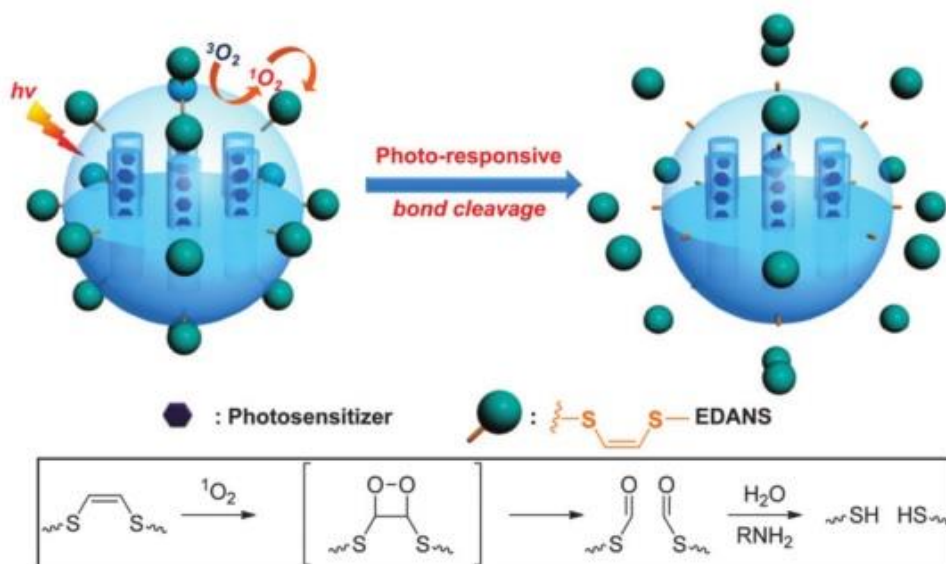


Figura 10 – Ilustração esquemática do modelo de libertação do fármaco com segmentos na sua superfície clivados pelo oxigénio singuleto produzido por um fotossensibilizador irradiado e mecanismo da clivagem pelo oxigénio singuleto. (adaptado [2])

Saravanakumar *et al.* desenvolveu outro sistema de entrega de fármacos biocompatível onde um copolímero de bloco anfifílico com estrutura micelar continha

## 2.4 Sistemas de libertação de fármacos por ativação do fotossensibilizador

um ligante de vinilditioéter sensível ao oxigénio singuleto na junção entre o núcleo e a “casca” da micela,  $^1\text{O}_2$ -PEG-*b*-PCL. Na presença do fotossensibilizador, a clorina e6, com uma irradiação de 3 horas através de um laser de  $50 \text{ mW cm}^{-2}$  e 660 nm, ocorreu o *disassembly* da estrutura micelar com libertação da doxorrubicina por clivagem do ligante provocada pelo oxigénio singuleto. Os fragmentos clivados do ligante não produziram qualquer tipo de espécies tóxicas para o organismo, o que tornou o sistema biocompatível [12]. A Figura 11 mostra o sistema de entrega de fármacos e o mecanismo de clivagem existente neste ensaio, semelhante ao referido anteriormente.

A vantagem associada às junções clivadas pela ação da luz passa por evitar qualquer tipo de reagente químico se mantenha no organismo e controlar a reação fora do sistema onde ela ocorre [40].

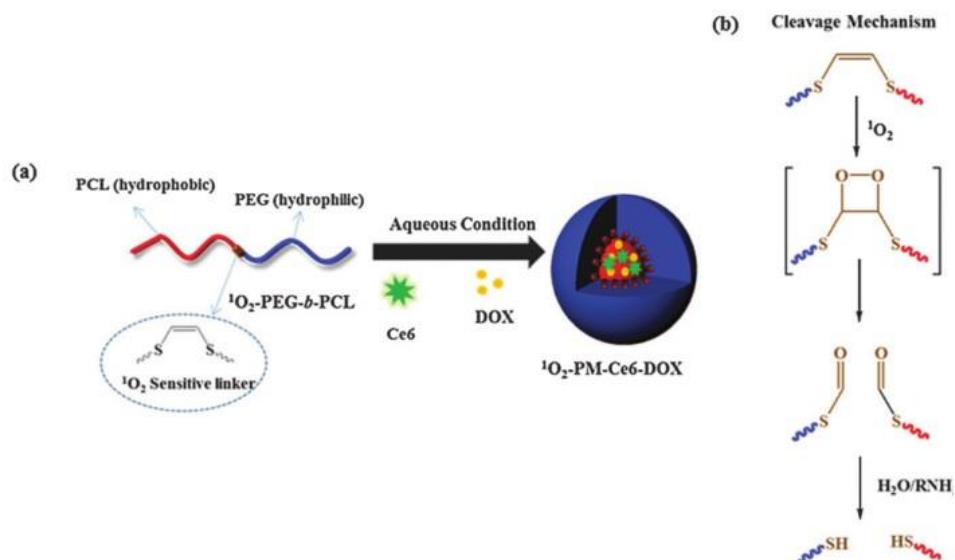


Figura 11 – a) Ilustração esquemática da formação do sistema micelar encapsulando Ce6 e Dox ( $^1\text{O}_2$ -PM-Ce6-DOX). b) Mecanismo de clivagem. (adaptado [12])

# 3 Materiais e Métodos

Este capítulo servirá para apresentar todos os materiais e métodos associados à preparação dos copolímeros de bloco, à análise da capacidade de *self-assembly* dos mesmos, à determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas, assim como, aos estudos de liberação do fármaco encapsulado após incidência de luz vermelha.

## 3.1 Materiais

O *rac*-lactide (3,6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione), o poli(etileno glicol) (PEG, MW5000, Sigma-Aldrich), a acetona, a trietilamina (TEA ou Et<sub>3</sub>N, >99%) e as pastilhas de tampão fosfato (PBS) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU, MW152,24), o *cis*-1,2-dicloroetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MW96,95), o 4-dimetilamino piridina (DMAP) e o vermelho nilo (NR) foram adquiridos à TCI Europe. O diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, forma pura), o isopropanol/2-propanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) e o tetrahidrofurano (THF) foram adquiridos à VWR Chemicals (Prolabo®). O éter etílico ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O, MW74,12) foi adquirido à José Manuel Gomes dos Santos, LDA. O tolueno (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, ACS grade) e o acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), o dimetilformamida (DMF) foram adquiridos à Fisher Scientific. A solução de metóxido de sódio 5.4 (30wt%) em metanol (NaOMe/MeOH), o 2-mercaptoetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), o sulfato de Sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MW142,02) e o N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 99%) foram adquiridos à Acros Organics. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido à Merck & Co., Inc.. O etanol 100% foi adquirido à Chem-Lab. A clorina e6 (Ce6) foi adquirida à Cayman Chemical Company e o cloridrato de doxorubicina (Dox HCl) à LC Laboratories. As membranas de diálise (MWCO 3500 Da) foram adquiridas à Orange Scientific. O clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>, 99,8%), e a água deuterada (D<sub>2</sub>O) foram adquiridos à Eurisotop. Os reagentes foram usados como recebidos, com exceção do *rac*-lactide que foi usada na forma recristalizada. Também o PEG foi previamente seco e destilado.

## 3.2 Métodos e Procedimentos

### 3.2.1 Síntese dos copolímeros de bloco (PEG-PLA)

A preparação dos copolímeros de bloco foi realizada de acordo com a referência [30]. Inicialmente, o PEG é “secado” pelo processo de destilação azeotrópica. Num balão de fundo redondo sob um banho-maria de óleo a 150°C, com agitação magnética, foram dissolvidos 20 g de PEG em 50 mL de tolueno – T<sub>e</sub> do tolueno é de 110,6°C. Após a evaporação do tolueno e das moléculas de água por si arrastadas, vai ocorrer uma condensação. Dado que ambos são imiscíveis, forma-se duas fases. Desta forma, após a destilação, a amostra é colocada num exsicador, com vácuo aplicado, de forma a eliminar possíveis moléculas de tolueno que ainda existam.

O copolímero de bloco PEG-PLA é sintetizado por polimerização por abertura de anel (ROP – *Ring Open Polymerization*) do monómero *rac*-lactide, usando o PEG-OH como iniciador.

O iniciador e o monómero são pesados e dissolvidos em CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> seco (utilizar ultrassons para garantir a completa dissolução) separadamente. Após agitação de 15 minutos, adiciona-se o iniciador ao balão volumétrico que contém o monómero. O catalisador orgânico, DBU, é dissolvido no solvente, e, já solubilizado, é adicionado à mistura reacional presente no balão volumétrico tampado, com o recurso a uma seringa. As quantidades de cada composto estão indicadas na Tabela 2, com os cálculos presentes no ANEXO A. A reação prosseguiu durante a noite. Depois deste período, a solução é evaporada no *RotoEvaporator Buchi R-114* a aproximadamente 39,6°C, correspondente ao ponto de ebulição de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>. No final desta etapa, cerca de 20% do solvente encontra-se evaporado.

O copolímero de bloco foi precipitado em isopropanol, seguida de filtração por decantação. A purificação do precipitado ocorre por dissolução em éter etílico. O excesso de solvente de purificação foi filtrado com o recurso a papel de filtro, funil de *Buchner*, rolha de borracha, *Erlenmeyer* e uma bomba de vácuo. O produto resultante foi seco numa estufa, *Vacucell*, durante a noite sob vácuo a 50 °C, dentro de uma caixa de Petri com papel de alumínio furado por cima.



Tabela 2 – Quantidades para a síntese do copolímero de bloco PEG-PLA.

	<b>rac-LA (monómero)</b>	<b>PEG (iniciador)</b>	<b>DBU (10%)</b>
<i>Síntese de PEG<sub>5k</sub>- PLA<sub>1k</sub></i>	0,8 g	1 g	83,08 µL
<i>Síntese de PEG<sub>5k</sub>- PLA<sub>1k</sub></i>	0,4 g	1 g	41,5 µL

### 3.2.2 Síntese do fragmento sensível ao oxigénio singuleto – SegS

A síntese do segmento sensível ao oxigénio singuleto, SegS, teve com diretrizes as referências [2], [41]. Num balão volumétrico colocou-se, com o auxílio de uma seringa, 7,40 mL de NaOMe/MeOH (elevada toxicidade e viscosidade). De seguida, foi adicionado, novamente com o recurso a uma seringa, 2,70 mL de 2-mercaptoetanol (solúvel em água e menos volátil). A reação está esquematizada na Figura 12.

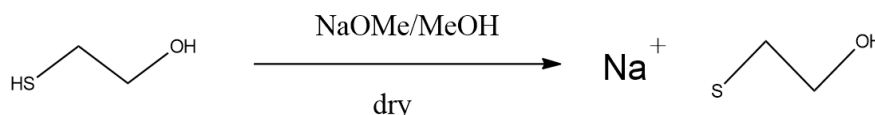


Figura 12 – Primeira etapa. Reação de formação da forma intermédia do SegS, com a formação de um sal.

Para garantir as condições ideais no processo de dissolução, o balão foi colocado dentro de um banho de gelo a agitar durante 2 horas. Após este período, foi retirado o banho de gelo e, durante 1 hora, mantida a agitação à rt. O metanol foi removido usando o *RotoEvaporator Buchi R-114* com um banho-maria a uma temperatura entre os 60-65°C (ponto de ebulição do metanol –  $T_e = 65^\circ\text{C}$ ). O sal formado é colocado no interior de um exsiccador, durante 1 dia, com uma bomba de vácuo ligada.

Na segunda etapa, foi adicionado num reator de pressão de 40 mL, com tampa em teflon, 20 mL de DMF seco. Em paralelo é adicionado num vial 1,560 mL de *cis*-

### 3. Materiais e Métodos

---

1,2-Dicloroetileno (muito volátil) e 1 mL de etanol 100%. A mistura reacional foi acrescentada ao DMF seco que se encontra em agitação. De seguida, o sal anteriormente formado foi acrescentado à solução no vial de 40 mL, que está revestido com papel de Al, para proteger a solução da luz presente. A reação ocorre sob agitação durante 3 dias à rt.

A última etapa da síntese do SegS engloba a diluição da solução obtida em água-Milli-Q® para lavagem da amostra. Neste processo foi colocado 40 mL de água-Milli-Q® num recipiente e depois vazado o conteúdo do vial. Após agitação momentânea da mistura, a mesma foi colocada num funil de decantação com 20 mL de éter etílico. O funil foi agitado manualmente, com vigor, para obter uma solução homogênea. Após agitação e obtenção de uma mistura bifásica, a torneira do funil é aberta: primeiro é vazado a água-Milli-Q®. Este processo repete-se por 4 vezes. A extração com éter etílico termina com nova adição de água-Milli-Q®, sendo esta extraída novamente por decantação. À mistura com éter etílico foi adicionado um agente secante, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para absorver a água-Milli-Q® ainda presente. Por filtração comum removeu-se o agente secante e a solução restante foi evaporada no *RotoEvaporator Buchi R-114*.

#### **3.2.3 Reação de ligação entre o copolímero de bloco e o SegS**

Esta fase engloba duas etapas: a síntese do macroiniciador (PEG-COOH + SegS) e a ligação à parte hidrofílica do polímero anfifílico.

A síntese do macroiniciador apresenta fundamento teórico na referência [12]. O SegS, sintetizado à priori, conjugou-se com o polímero PEG carboxílico, PEG-COOH, por reação de esterificação de *Steglich*, formando o PEG-COOSegSOH.

O PEG-COOH (2,128 g; 0,952 mmol) foi adicionado ao SegS (0,270 g; 3,355 mmol) dissolvido em 30 mL de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>. Após tratamento de azoto a que foram submetidos, o DCC (0,176 g; 1,904 mmol), e o DMAP (0,0520 g; 0,952 mmol), dissolvidos separadamente em 15 mL de solvente, foram adicionados gota-a-gota à solução, respetivamente. A solução esteve durante 48 horas a agitar à rt. A ureia N,N'-ciclohexil precipitada foi removida por filtração. Depois da evaporação de

### 3. Materiais e Métodos

---

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, procedeu-se à precipitação em éter etílico, obtendo-se o macroiniciador, PEG-COOSegOH. O macroiniciador foi purificado em THF, colocado num banho-maria de óleo a 45-50°C. Com o objetivo de purificar o produto foram feitas várias precipitações em éter etílico deste material. O produto final foi filtrado, seco sob vácuo e conservado dentro do exsiccador, sob vácuo.

Relativamente à segunda etapa, que liga o macroiniciador ao PLA, o processo é semelhante ao explanado no subcapítulo “Preparação dos copolímeros de bloco”. O macroiniciador e o *rac*-lactide foram dissolvidas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, separadamente. O DBU foi depois dissolvido no mesmo solvente e adicionado à mistura reacional contendo o monómero e o iniciador. Após evaporação do solvente, foi realizada a precipitação em isopropanol, procedida por dissolução em éter etílico. Após filtração, o copolímero de bloco fotossensível PEG-seg-PLA, foi seco numa estufa, durante a noite sob vácuo a 50°C, terminando assim o processo de abertura do anel do *rac*-lactide.

## 3.2.4 Caracterização

### 3.2.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de <sup>1</sup>H, do inglês *Proton Nuclear Magnetic Resonance*, para avaliar a síntese dos copolímeros e segmento sensível até aqui referidos foram obtidos num espectrómetro *Bruker Avance III 400MHz*, com uma sonda de deteção de ressonância tripla 5-mm TXI, em CDCl<sub>3</sub> e Água Deuterada. Os espectros foram analisados através do software *MestReNova LITE*, versão 5.2.5-5780.

### 3.2.4.2 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC/GPC)

A técnica de Cromatografia por Exclusão de Tamanho, usada para avaliar o peso molecular dos polímeros em causa, foi realizada por um sistema *GPC/SEC OMNISEC* da *Malvern Panalytical*. Quanto ao procedimento, a amostra era dissolvida em DMF para Sec e, após agitação com o recurso a um shaker, filtrada através de um

filtro de Nylon para seringas com tamanho de poro de 20  $\mu\text{m}$ . Os valores do peso molecular para caracterização dos polímeros foram lidos no software *OMISEC*, versão 4.6.1.354.

## **3.2.5 Formação das nanopartículas e Concentração Micelar Crítica**

### **3.2.5.1 Formação de nanopartículas**

Os métodos realizados para formar as nanopartículas, partindo dos copolímeros, basearam-se nas referências [42], [43], [44]. A escolha dos mesmos teve como pressuposto a existência de um solvente que solubilize todos os elementos da mistura. Qualquer dos fatores da experiência influenciam o tamanho das nanopartículas: a ordem e a velocidade do gotejamento da água e do solvente; a concentração do polímero; a velocidade de agitação no processo; e a temperatura à qual ocorre a evaporação do solvente.

Inicialmente, as nanopartículas foram preparadas por Evaporação do Solvente. Num vial foi pesado 1 mg de polímero, posteriormente dissolvido em 1 mL de THF. Noutro vial foi pesado 1 mg do fotossensibilizador dissolvido no mesmo volume de solvente. Deste último, retirou-se uma quantidade volumétrica, tendo em conta a relação de proporcionalidade entre o polímero e o fotossensibilizador (1:1 ou 15% do peso do polímero), que é pipetada no vial com o polímero. Seguidamente, gotejou-se 1 mL de água-Milli-Q® e tapou-se com folha de Al furada para evaporação á rt. Passadas 24 horas, filtrou-se a solução com o recurso a um filtro de Nylon para seringas de vários tamanhos de poro – 0,20  $\mu\text{m}$ . Neste método, produziu-se ainda outra solução, onde a acetona substituiu o THF como solvente, que foi adicionada a 1 mL de água-Milli-Q® a agitar a 400 rpm [4].

Também se preparou micelas por “*Film Sonification*”. Neste método, dissolveu-se separadamente 2 mg de polímero em 2 mL de acetona e 1 mg de fotossensibilizador em 1 mL de acetona. Seguidamente adiciona-se a 1 mL da solução polimérica uma porção volumétrica do fotossensibilizador (150  $\mu\text{L}$ ). Esta solução foi deixada a evaporar durante a noite sob agitação a 400 rpm. Após evaporação, adicionou-se a água-Milli-Q® à solução sob um banho de ultrassons durante 1 minuto [45]. Finalmente, com um filtro para seringas escolhido, a solução é filtrada.

A Dissolução Direta também permitiu formar nanopartículas. Neste método de formação de nanopartículas, água-Milli-Q® foi usada como solvente. Para o efeito, dissolveu-se 1 mg de polímero e de fotossensibilizador separadamente, em 1 mL de água ultrapura. De seguida, colocou-se uma porção volumétrica (150 µL) da solução com o fotossensibilizador dissolvido, na solução polimérica. Após a mistura do fotossensibilizador na solução polimérica, a solução fica a agitar durante a noite a 400 rpm [46]. Após este período, a solução é filtrada.

As nanopartículas de PEG-PLA foram ainda preparadas pelo método de Diálise. 1 mg de copolímero e de fotossensibilizador foram dissolvidos em 1 mL de DMSO, separadamente. Após mistura de uma determinada porção da solução do fotossensibilizador (150/300 µL) com a solução do polímero, esta foi seringada para uma solução de 1 mL de água-Milli-Q® sob um agitador magnético. A agitação decorre durante 30 minutos. A par deste processo, uma membrana de diálise (MWCO 3500 Da) é colocada em água destilada a hidratar. Passado esse período, retirou-se a solução do vial com a ajuda de uma seringa e inseriu-se na membrana de diálise. No interior da mesma colocou-se um ímã e fechou-se em ambos os lados. Esta membrana foi depois colocada dentro de um recipiente sob uma placa de agitação, com cerca de 100 vezes mais água destilada em relação à quantidade volumétrica da membrana, 2 mL, e um ímã. Nesta etapa, a água destilada foi sendo renovada regularmente, estando o processo concluído após 24 horas [46]. A solução foi filtrada por dois filtros de PTFE-Teflon para seringas – 0,45 µm e 1 µm, respetivamente.

#### **3.2.5.2 Formação de nanopartículas**

O CMC foi determinado, recorrendo ao método de fluorescência com o Vermelho do Nilo (NR) como amostra hidrofóbica. O procedimento para a caracterização do CMC, abaixo descrito, teve como modelo a referência [43].

Inicialmente dissolveu-se 1 mg de NR em 1 mL de THF num vial a agitar no shaker durante a noite. Após este período, diluiu-se a solução inicial numa dada quantidade de THF, de forma a perfazer uma solução de 2,5 mL. Em paralelo, obteve-se diferentes soluções do polímero de interesse representadas na Tabela 3.

### 3. Materiais e Métodos

Tabela 3 - Soluções de polímeros dissolvidos em THF.

Solução	Polímero	THF (mL)	Concentração (mg/mL)
A	1 mg	2,5	0,4
B	200 $\mu$ L de sol A	19,8	0,004
C	100 $\mu$ L de sol B	9,9	0,00004
D	50 $\mu$ L de sol C	5,0	0,0000004

Partindo destas soluções, obteve-se outras soluções poliméricas com THF de concentrações que variaram entre  $1 \times 10^{-7}$  e  $1 \times 10^{-1}$  mg/mL. Em cada um dos vials foi adicionado cada uma das soluções, dissolvendo-se em 50  $\mu$ L de NR. De seguida gotejou-se 2 mL de água-Milli-Q®. A Figura 13 esquematiza a metodologia em causa.

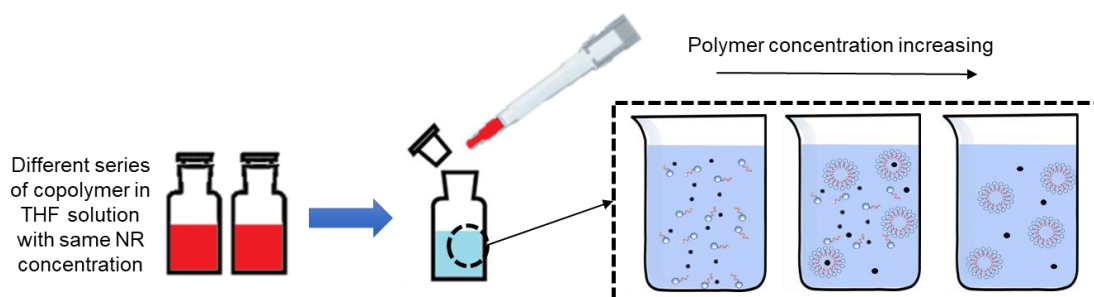


Figura 13 – Esquema da metodologia para a determinação do CMC.

Durante a noite, todos os vials, colocados sob agitação magnética, foram tapados com papel de Al furado no topo para evaporação do solvente à rt. Os ensaios de fluorescência foram realizados no espectrofotómetro de fluorescência *PerkinElmer LS 45*. O ensaio passa por colocar 2mL de solução numa célula de quartzo de 10mm<sup>2</sup>. Aplicando uma excitação de 550nm num espectro de emissão entre os 500-750nm com um rácio de varredura de 500nm min<sup>-1</sup>, é possível obter uma curva representativa a intensidade da emissão em função da concentração do polímero.

### 3.2.6 Determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas

A Dox foi encapsulada pelo método de Diálise. Prepararam-se três soluções: a solução polimérica, com 6 mg do polímero dissolvidos em 3 mL de DMSO; a solução com o fármaco, com 4,5 mg de Dox HCl dissolvidos em 1,045 mL de DMSO e 2,16  $\mu$ L de TEA (neutralizador do pH ácido); e a solução do fotossensibilizador, que corresponde a 1 mg de Ce6 dissolvidos em 1 mL de DMSO. A agitação num shaker das 3 soluções ocorreu durante 2 horas. Seguidamente, prepararam-se 6 amostras a partir das 3 anteriores soluções. A cada uma delas foi adicionado 1 mL de água-Milli-Q® e DMSO até perfazer 1 mL de solvente. O conteúdo dessas amostras está representado na Tabela 4.

*Tabela 4 – Composição das amostras para determinação do DLC e DLE. wt% - fração da massa em relação ao polímero.*

<i>Amostra</i>	<b>Dox (wt%)</b>	<b>Ce6</b>	<b>sol pol (<math>\mu</math>L)</b>
<i>A</i>	100	-	500
<i>B</i>	50	-	500
<i>C</i>	100	1:1 molar	500
<i>D</i>	50	1:1 molar	500
<i>E</i>	100	5 wt%	500
<i>F</i>	50	5 wt%	500

Dissolveram-se estas amostras em DMSO e gotejou-se em vials com água Milli-Q®, a agitar durante 30 minutos com um magnete no seu interior. Após este período, colocou-se a mistura reacional dentro de uma membrana de diálise (MWCO 3500 Da) previamente hidratada. Essa membrana, fechada em ambos os lados e com um magnete no seu interior, foi colocada num recipiente com aproximadamente 100 vezes mais de água destilada contendo 2/3 gotas de TEA. Durante 24 horas, a água destilada foi renovada regularmente. O processo terminou com a filtragem das amostras com o recurso a dois filtros de PTFE: um de 1  $\mu$ m de tamanho do poro, que impediu a passagem de partículas de grandes dimensões que não foram encapsuladas, seguido de um de 0,45  $\mu$ m, que deixou passar apenas as partículas de interesse. Na Figura 14 estão apresentados ambos os filtros.





calibração.

A capacidade de encapsulação das estruturas micelares é determinada pelo valor de DLC e DLE, representado na Equação 1 e 2 [47]:

$$DLC(\%) = \frac{\text{mass of probe loaded}}{\text{mass of copolymer}} * 100 \quad (\text{Equação (1)})$$

$$DLE(\%) = \frac{\text{mass of probe loaded}}{\text{mass of probe used}} * 100 \quad (\text{Equação (2)})$$

#### **3.2.7 Estudo da liberação de material encapsulado após incidência de luz vermelha**

O procedimento que permite determinar a taxa de liberação do fármaco encapsulado após a incidência de luz vermelha depende das amostras obtidas na etapa de encapsulação e baseou-se nas referências [48], [49]. As amostras foram escolhidas dependendo da presença do fotossensibilizador e da quantidade de fármaco encapsulado. Cada uma delas foi irradiada durante 2 horas. Após irradiação, a amostra foi colocada dentro de uma membrana de diálise (MWCO 3500 Da), devidamente hidratada, com um ímã no seu interior. Posteriormente colocou-se esta membrana no interior de um vial com 5 mL de PBS. De forma a mimetizar as condições ambientais do corpo humano, os vials foram colocados a agitar sob um banho-maria a 37°C. Com o intuito de se conseguir pontos temporais suficientes para delinear a taxa de liberação do material, ao fim de 20 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas, retirou-se 2 mL da solução envolvente à membrana de diálise, com posterior reposição da mesma quantidade de PBS. O estudo da quantidade de Dox presente fez-se com o recurso ao espectrofotômetro de fluorescência já mencionado, onde se estipula, no espectro de emissão, uma excitação a 480 nm.

À semelhança dos ensaios para o cálculo do DLC e DLE, também foi necessário obter uma curva de calibração do Dox no solvente para os estudos de liberação. O procedimento foi semelhante ao indicado no subcapítulo “Determinação

### 3. Materiais e Métodos

---

da capacidade de encapsulação das estruturas micelares”, sendo o DMSO substituído pelo PBS como solvente.

# 4 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Assim, este capítulo engloba várias etapas: a síntese e caracterização dos polímeros; a preparação e caracterização das nanopartículas; a determinação do CMC micelar; a determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas, através do cálculo do DLC e DLE; e o estudo da liberação do fármaco pelas nanopartículas.

## 4.1 Síntese e Caracterização dos polímeros

### 4.1.1 PEG-PLA – síntese e caracterização

A síntese dos copolímeros de bloco (PEG-PLA) sem o segmento sensível ao oxigênio singuleto teve como objetivo determinar, à posteriori, qual o comportamento das nanopartículas sem o segmento sensível, após irradiação na presença de um fotossensibilizador. A reação de polimerização está esquematizada na Figura 16.

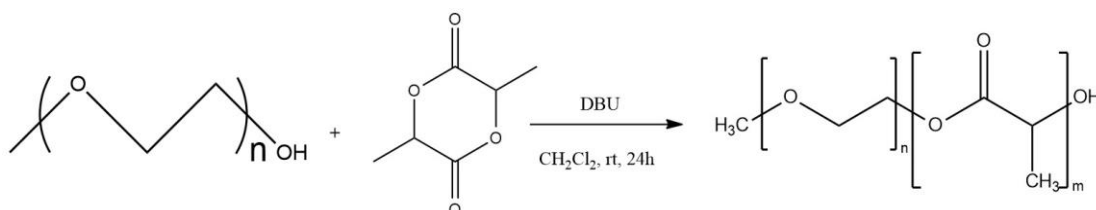


Figura 16 – Síntese do copolímero PEG-PLA através da reação química de polimerização por abertura de anel. iniciador – PEG; monómero - *rac*-LA.

A síntese dos copolímeros de bloco (PEG-PLA) ocorre por ROP seguindo os processos descritos na literatura [2], [12], [30]. O objetivo passou pela produção de dois copolímeros de bloco com pesos moleculares diferentes – PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub> e PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub>. Ao manter o peso molecular da parte hidrofílica, é possível observar como variam as características estruturais e funcionais poliméricas em função da variação da parte hidrofóbica.

O catalisador utilizado, DBU, segundo a síntese de *Waymouth, Hedrick et al.* [50], para além de ser um dos catalisadores comuns para reações de polimerização por abertura do anel do *rac*-lactide, é também mais fácil de manusear em relação a outras

#### 4. Resultados e Discussão

superbases. A sua elevada atividade leva a um controlo do tamanho do copolímero, bem como a uma distribuição mais estreita de pesos moleculares [30]. Através da análise do espectro  $^1\text{H}$  RMN, verificou-se que o valor do peso molecular relativo ao PLA se encontrava abaixo ao esperado tendo em conta a quantidade de monómero utilizada inicialmente. Como tal, aumentou-se a quantidade de catalisador em solução. Ao invés de 1% do número de moles de DBU face ao número de moles de monómero, utilizou-se 10%.

Após o procedimento experimental, a estrutura foi comprovada pelo espectro  $^1\text{H}$  RMN, e pela análise SEC/GPC, em DMF.

A Figura 17 apresenta o espectro  $^1\text{H}$  RMN, em  $\text{CDCl}_3$ , como resultado da reação de ROP que conduziu à síntese do copolímero de bloco  $\text{PEG}_{5k}\text{-PLA}_{1k}$ .

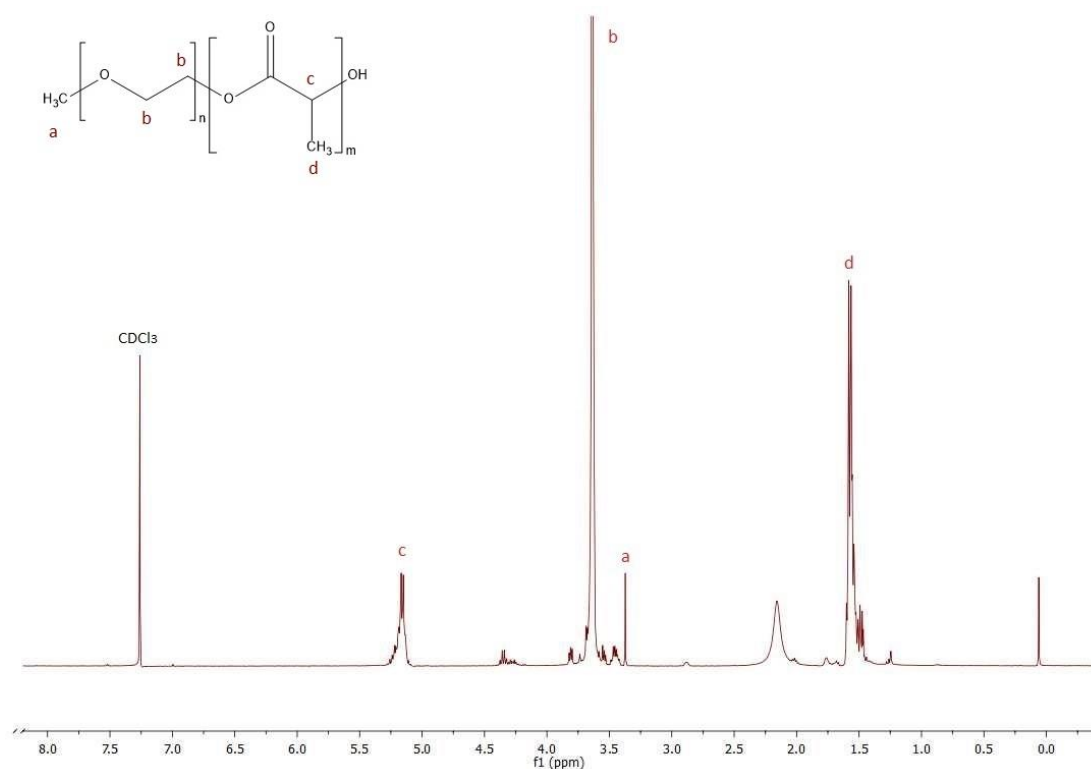


Figura 17 – Espectro  $^1\text{H}$  NMR como resultado da síntese do copolímero de bloco  $\text{PEG}_{5k}\text{-PLA}_{1k}$ , em  $\text{CDCl}_3$ .

Os sinais entre o desvio químico  $\delta$  1,4-1,6 ppm dizem respeito aos hidrogénios do grupo metil do PLA (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ). Próximo de  $\delta$  2,80 ppm surge o sinal relativo ao álcool, OH. Entre  $\delta$  3,4-3,7 ppm correspondem aos hidrogénios da cadeia central que se repete do PEG (b, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), e ao grupo metil do PEG (a, 3H,  $\text{CH}_3$ ). Entre  $\delta$  5-5,5 ppm, pertencem aos hidrogénios do grupo metino do PLA (c, 1H, CH).

#### 4. Resultados e Discussão

Por intermédio da integração da área correspondente aos sinais referidos, é feito o cálculo do peso molecular de PEG e PLA, como demonstra a equação 3:

$$M_n \text{ (g/mol)} = \frac{\text{Integração da área do pico}}{N^\circ \text{ Hidrogénios}} \times \text{Massa Molar} \quad (\text{Equação (3)})$$

A integral do sinal (a) foi normalizada para o valor 3, uma vez que corresponde aos 3 hidrogénios do grupo metil do PEG. Com a normalização e considerando que  $\text{Massa Molar}_{PEG} = 44 \text{ g/mol}$  e que  $\text{Massa Molar}_{PLA} = 72 \text{ g/mol}$ , o sinal (d), onde o valor de integração é de 52,52, apresenta  $M_{n(RMN)}PLA = 1260,48 \text{ g/mol}$ . Para o sinal (c), com valor de integração de 10,09,  $M_{n(RMN)}PLA = 726,48 \text{ g/mol}$ . Para o sinal (b) e (a), o valor de integração é de 463,19, logo  $M_{n(RMN)}PEG = 5096,19 \text{ g/mol}$ .

Daqui conclui-se que o valor do  $M_{n(RMN)}PEG$  está em concordância com o seu valor do fabricante (5000 g/mol). Para o PLA, dos dois valores  $M_{n(RMN)}PLA$  calculados, obtém-se um valor médio de 993,48 g/mol, também ele próximo do valor esperado (1000 g/mol). Estes resultados demonstram que a reação de ROP originou o produto final esperado.

Para o copolímero PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub>, segundo a mesma análise, e partindo da integração da área do sinal de 464,28,  $M_{n(RMN)}PEG = 5107,08 \text{ g/mol}$ .  $M_{n(RMN)}PLA = 2724 \text{ g/mol}$  e  $2448 \text{ g/mol}$ , segundo uma integração de 113,50 e 34,00, respetivamente. O espectro deste copolímero está apresentado na Figura A1 do ANEXO A.

O  $M_{n(RMN)}PLA$  apresentou valores acima do esperado, o que demonstra uma maior taxa de conversão do *rac*-lactide no polímero. Desta forma, o copolímero correspondente tem um peso molecular para a parte hidrofílica diferente do esperado, ou seja,  $M_nPLA = 2500 \text{ g/mol}$ .

Também se analisaram os dois copolímeros de bloco por SEC/GPC de forma a determinar o peso molecular absoluto dos mesmos. A análise SEC é precedida do cálculo do índice de refração específico – dn/dc – de cada polímero, permitindo, a partir do mesmo, obter o  $M_n$  absoluto. Este parâmetro está dependente da concentração da diferença no índice de refração da solução diluída do polímero e do

#### 4. Resultados e Discussão

solvente puro correspondente [30]. O DMF foi usado como solvente, realizando-se todas as medições no refratômetro a 60°C. Pela Tabela 5, observa-se que o  $M_n$  assume um valor maior ao esperado e ao obtido via  $^1\text{H NMR}$ .

Tabela 5 –  $M_n$  e PDI obtidos através da Análise SEC com recurso ao software OmniSEC 4.6.1., por intermédio de uma Calibração Universal.  $dn/dc$  medido num Refratômetro e  $dn/dc$  calculado através de uma equação da literatura [51], presente no Anexo B.

<b>Polímero</b>	<b><math>dn/dc</math> (mL/g) (medido)</b>	<b><math>M_n</math></b>	<b><math>dn/dc</math> (mL/g) (calculado)</b>	<b>PDI (<math>M_w/M_n</math>)</b>
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub></i>	0,05350	6582	0,05508	1,010
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub></i>	0,05190	7585	0,05516	1,035

<sup>a</sup> Estimado por SEC, usando poliestireno como standard.

De salientar que, no cálculo do  $dn/dc$ , o coeficiente de determinação,  $R^2$ , da reta de regressão linear do gráfico Índice de Refração em função da concentração tomou um valor muito próximo de 1 (Figura B1 do ANEXO B). Observa-se para os polímeros um baixo índice de polidispersividade, concluindo-se assim que os polímeros formados apresentam uma distribuição homogénea no que concerne ao seu tamanho.

#### 4.1.2 SegS – Síntese do Segmento Sensível

A etapa seguinte do trabalho consistiu na síntese do segmento sensível ao oxigénio singuleto, SegS, com o objetivo de sintetizar posteriormente um copolímero de bloco contendo esse segmento sensível.

Seguiu-se um procedimento descrito que consistiu na reação entre o 2-mercaptoetanol e uma solução de metóxido de sódio (30wt%) em metanol. Após a evaporação do metanol e conseqüente formação de um sal em pó solto, este reagiu com o composto orgânico, cis-1,2-dicloroetileno, formando assim o SegS. A reação está esquematizada na Figura 18.

#### 4. Resultados e Discussão

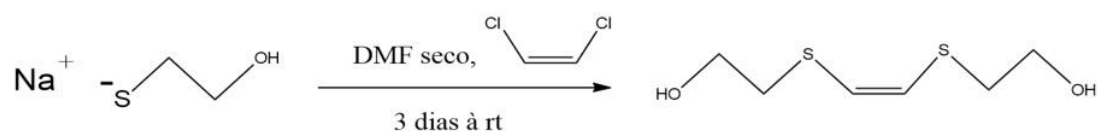


Figura 18 – Reação de formação do segmento sensível SegS, após ligação entre o sal formado anteriormente e o composto orgânico, *cis*-1,2-dicloroetileno.

O espectro do produto final desta reação está apresentado na Figura 19.

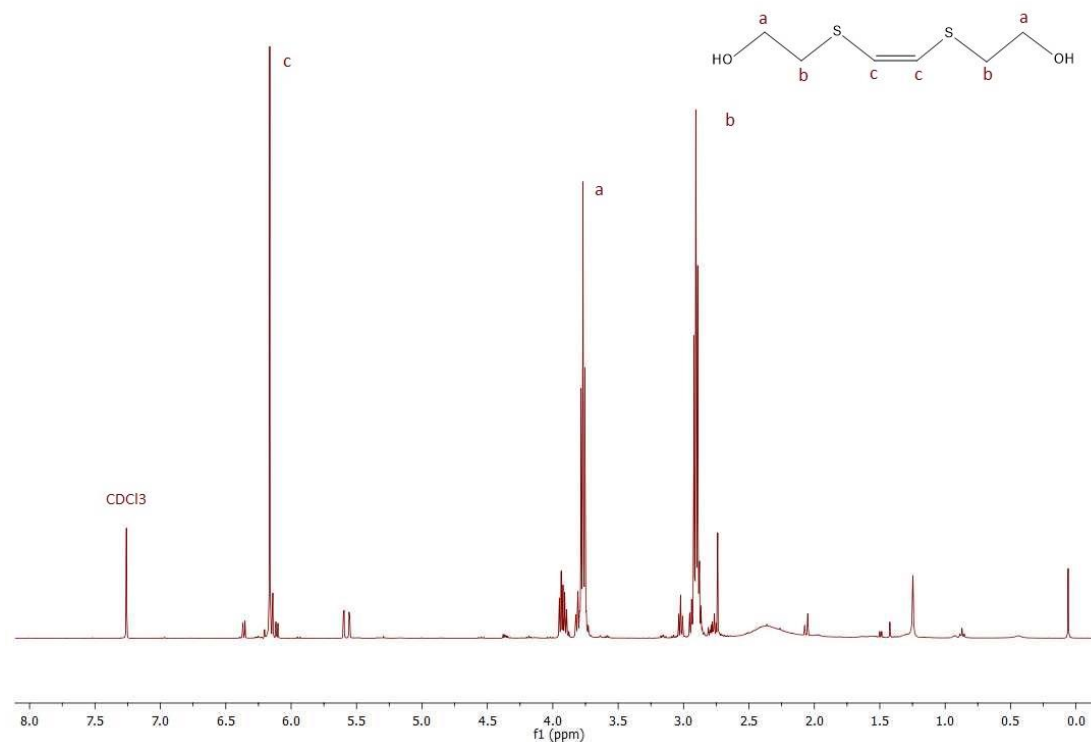


Figura 19 – Espectro  $^1\text{H}$  RMN como resultado da síntese do segmento sensível à luz externa (SegS), em  $\text{CDCl}_3$ .

Da Figura 19, o sinal (c) representa o hidrogénio da dupla ligação, -SCH=CHS-. O seu valor foi de  $\delta$  6,16 ppm. O sinal (a) pertence aos dois hidrogénios do carbono próximo do grupo hidroxilo, OH. Para este sinal,  $\delta$  3,77 ppm. Já para o sinal (b), dos dois hidrogénios do carbono próximo do elemento químico enxofre, S, apresentou  $\delta$  2,91 ppm. O rendimento da reação foi de 10%.

### 4.1.3 PEG-seg-PLA – síntese e caracterização

Depois da síntese e caracterização do SegS, é realizada a síntese do copolímero de bloco PEG-seg-PLA. Assim, realizou-se um conjunto de reações esquematizadas na Figura 20.

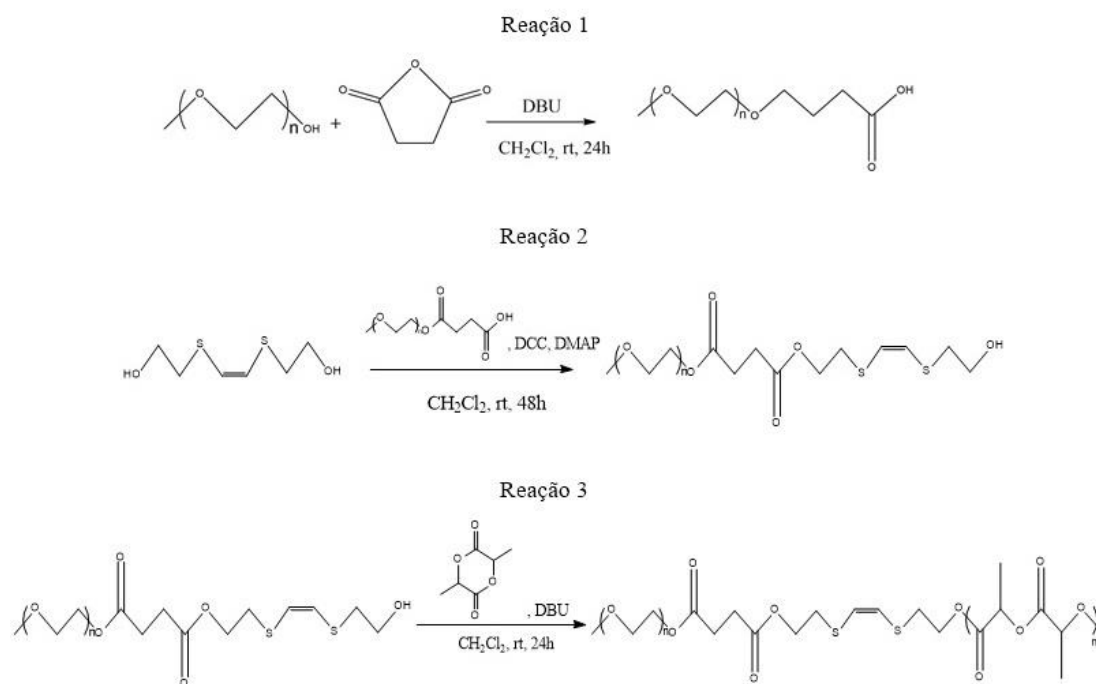


Figura 20 – Reação 1: abertura de anel do anidrido succínico usando o iniciador mPEG; Reação 2: esterificação de *Steglich* entre o SegS e o PEG-COOH, formando o macroiniciador; Reação 3: abertura de anel da rac-LA usando PEG-COO-SegS como macroiniciador para formar o copolímero de bloco PEG-seg-PLA.

Inicialmente ocorreu a síntese do PEG-COOH por ROP, representada na reação 1 da Figura 20, de forma a ser possível a ligação com o grupo OH do SegS.

Com a síntese do PEG-COOH, procedeu-se à sua conjugação com o SegS por esterificação de *Steglich*, como representado na reação 2 da Figura 20.

Na reação de esterificação de *Steglich*, o composto orgânico, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), funcionou como ativador e o 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como o catalisador nucleofílico.

O sucesso da conjugação do SegS ao PEG-COOH é confirmado pela presença do sinal característico da dupla ligação (-SCH=CHS-), cis-alceno, a  $\delta$  6,18 ppm, relativamente ao SegS, bem como dos sinais do PEG a  $\delta$  3,36 ppm e  $\delta$  3,62 ppm, para



#### 4. Resultados e Discussão

CH<sub>3</sub>-O- e -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- respetivamente, no espectro <sup>1</sup>H RMN. O mesmo apresenta-se na Figura C1 do ANEXO C.

A preparação do copolímero de bloco unido pelo fragmento sensível ao singuleto de oxigénio (SegS) é conseguida pela polimerização por abertura de anel do *rac*-lactide, na presença do macroiniciador e do DBU como catalisador. Esta polimerização está descrita na reação 3 da Figura 20.

A estrutura química do copolímero de bloco foi posteriormente confirmada pelo espectro <sup>1</sup>H RMN, apresenta na Figura 21.

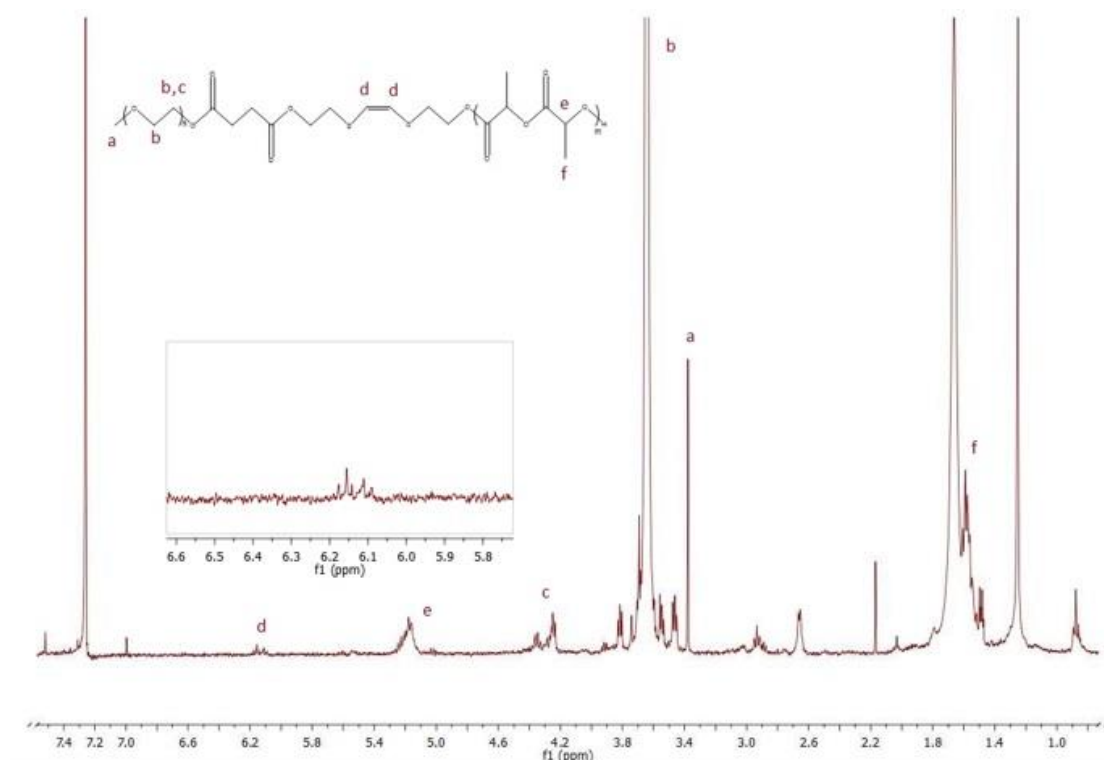


Figura 21 – Espectro <sup>1</sup>H NMR como resultado da síntese do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>, em CDCl<sub>3</sub>.

Os sinais de ressonância correspondem aos segmentos de PEG, PLA e SegS observados. A composição do copolímero, à semelhança do copolímero sem SegS, estimada pela comparação dos rácios de integração dos sinais a  $\delta$  3,54 ppm dos hidrogénios do cadeia central do PEG que se repete,  $(\text{CH}_2\text{-CH}_2) - M_{n(RMN)}\text{PEG} = 4512,97\text{g/mol}$  – e dos sinais a  $\delta$  1,54 ppm e  $\delta$  4,97 ppm do PLA –  $M_{n(RMN)}\text{PLA} = 658,80\text{g/mol}$  e  $991,92\text{g/mol}$  –, respetivamente. Já para o SegS a integração do sinal a  $\delta$  6,18 ppm assume um valor próximo de 2, como o esperado. O ligeiro desvio químico em relação ao valor da literatura do SegS ( $\delta$  6,12 ppm [12]) deve-se aos

#### 4. Resultados e Discussão

vários fragmentos de PLA que apresentam pesos moleculares variáveis entre si. O espectro evidencia ainda a presença do solvente, éter etílico, a  $\delta$  1,21 ppm.

Repetimos esta experiência agora tendo como objetivo a obtenção de um PLA de maior peso molecular. No caso do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub>, segundo a mesma análise do espectro <sup>1</sup>H RMN da Figura C2 do Anexo C, obteve-se o  $M_{n(RMN)}PEG = 4581,39g/mol$  e  $M_{n(RMN)}PLA = 2520,72g/mol$  e  $2407,68g/mol$ , relativamente aos mesmos sinais do parágrafo anterior. Quanto ao SegS a integração do sinal a  $\delta$  6,18 ppm apresenta um valor mais afastado de 2, relativamente ao copolímero anterior, aumentando assim o desvio químico face ao valor da literatura.

A síntese de ambos os copolímeros teve um rendimento próximo de 60%. Para o copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub>, o rendimento da reação foi de 53%. O último passo da reação de polimerização do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> teve um rendimento de 59%.

À semelhança do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub>, o copolímero de bloco com o mesmo peso molecular, mas com o segmento sensível apresentou um valor para o bloco PLA ligeiramente acima (2500) do valor esperado (2000 g/mol). Da análise SEC/GPC obtém-se os resultados descritos na Tabela 6 que corrobora os resultados obtidos por espectroscopia <sup>1</sup>H RMN.

Tabela 6 –  $M_n$  e PDI obtidos através da Análise SEC com recurso ao software OmniSEC 4.6.1., por intermédio de uma Calibração Universal.  $dn/dc$  medido num Refratómetro.

<b>Polímero</b>	<b><math>dn/dc</math> (mL/g) (medido)</b>	<b><math>M_n</math></b>	<b>PDI<sup>a</sup> (<math>M_w/M_n</math>)</b>
<i>PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub></i>	0,05140	6540	1,026
<i>PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub></i>	0,04520	7525	1,010

<sup>a</sup> Estimado por SEC, usando poliestireno como standard.

## 4.2 Preparação e Caracterização das nanopartículas

Em virtude das características anfotéricas, os copolímeros de bloco formam estruturas nanométricas, em meio aquoso, que denotam capacidades de se organizar segundo o fenómeno de *self-assembly*.

### 4.2.1 Métodos de Preparação de nanopartículas

Segundo a literatura, são vários os métodos para a formação das nanopartículas. Considerando a estrutura dos copolímeros que preparámos, os solventes que podemos utilizar e as características de solubilidade do fotossensibilizador e do fármaco a encapsular, procurámos na literatura fazer uma seleção dos métodos que se encontram descritos.

Para a avaliação do melhor método de encapsulação utilizámos a técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS). No que concerne a esta técnica, existe uma luz laser que passa por um polarizador atingindo a cuvete onde se encontra a amostra. Devido ao movimento Browniano das partículas e considerando o fenómeno de Dispersão de *Rayleigh*, a luz dispersa-se com diferentes intensidades, como demonstra a Figura 22. [52]. Por DLS podemos conhecer o tamanho médio das partículas correspondentes às nanopartículas dispersas num meio aquoso e aferir a distribuição das partículas segundo o seu tamanho.

#### 4. Resultados e Discussão

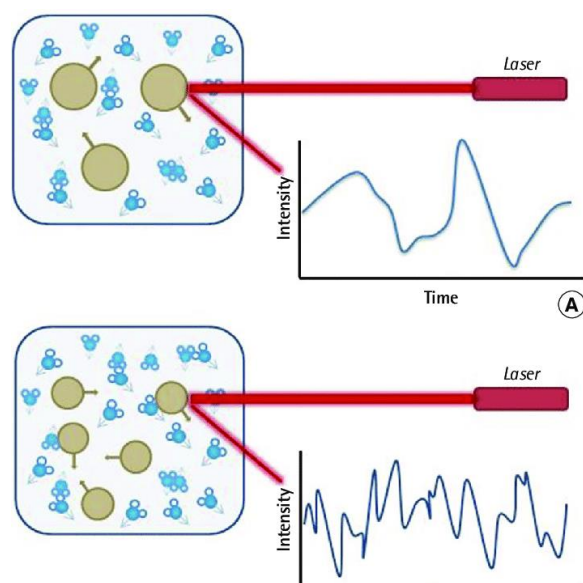


Figura 22 – Flutuação hipotética da dispersão da luz por DLS para grandes (em cima) e pequenas partículas (em baixo). Quanto maior o tamanho das partículas, maior é a intensidade da dispersão da luz. (adaptado [52])

Nesta figura é perceptível que as partículas de menores dimensões têm variações de intensidade de luz dispersa mais acentuadas quando comparadas com as de maior tamanho, devido ao movimento mais rápido das partículas pequenas. Tendo como aproximação que as partículas são esféricas, o cálculo do diâmetro efetivo, ou hidrodinâmico, das partículas em equilíbrio com o solvente é dado pela equação de *Stokes-Einstein* [53]:

$$D_{ef} = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_T} \quad (\text{Equação (6)})$$

sendo  $K_B$  a constante de *Boltzman*,  $T$  a temperatura,  $\eta$  a viscosidade e  $D_T$  o coeficiente de difusão.

Com o equipamento da *Malvern Panalytical*, o *Zetasizer Nano-ZS*, representado na Figura 23, acoplado a um computador, é possível obter os valores da intensidade de sinal, polidispersividade e do tamanho médio das partículas. Estes valores surgem por intermédio do software *Zetasizer*, versão 7.12.

#### 4. Resultados e Discussão

---



Figura 23 - Zetasizer Nano ZS, da Malvern Panalytical. (adaptado [54])

Com o objetivo de definir o melhor método de formação das nanopartículas presente na literatura, obteve-se para cada método uma amostra onde as nanopartículas apresentavam um fotossensibilizador encapsulado.

A escolha do fotossensibilizador, recaiu sobre a classe das porfirinas pois, como referido anteriormente, para além das suas boas capacidades como fotossensibilizadores, são compostos com muito baixa toxicidade.

Dentro da classe das porfirinas, selecionaram-se 4 porfirinas existentes em laboratório: ACS-5, TPP, Hidroxi e a Clorina e6, presentes na Figura 24.

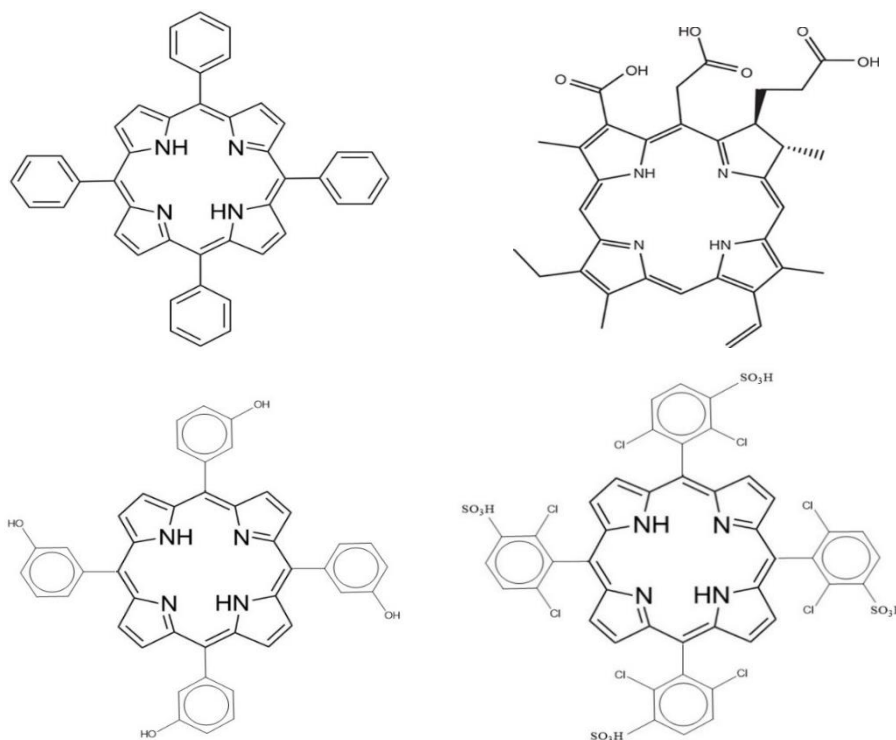


Figura 24 – Estrutura das porfirinas usadas com fotossensibilizadores, TPP, Ce6 (em cima, da esquerda para a direita), Hidroxi e ACS-5 (em baixo, da esquerda para a direita).

#### 4. Resultados e Discussão

Por espectrofotometria de UV-visível das porfirinas concluiu-se que a clorina e6 apresenta um pico de absorvância mais intenso na zona do comprimento de onda do laser de interesse – zona do vermelho.

O filtro usado após o método de formação das nanopartículas constitui outro fator influenciador da análise das características das nanopartículas. Inicialmente, as amostras foram filtradas com o recurso a um filtro de nylon, com uma malha de 0,20µm. Da filtragem resultaram soluções límpidas. Pela análise das nanopartículas através do software *Zetasizer*, observou-se um índice de polidispersividade elevado, bem como partículas de grandes dimensões sedimentadas. Concluiu-se que o filtro de nylon reteve a grande maioria das nanopartículas de interesse e que essa retenção poderia estar ligada à natureza do filtro. Como solução encontrada, utilizou-se um filtro de maiores dimensões dos poros, 0,45 µm, e feito de PTFE.

Quanto à escolha do método de formação das nanopartículas, a Tabela 7 mostra os resultados para cada um deles.

*Tabela 7 – Resultados da análise DLS, disponibilizados pelo software Zetasizer, para os diferentes métodos de formação de nanopartículas.*

<b>Método</b>	<b>Observação</b>
<i>Evaporação de Solvente</i>	Elevado índice de polidispersividade (0,860)
<i>“Film Sonification”</i>	Partículas de grandes dimensões (343,2 ± 1,858) nm
<i>Dissolução Direta</i>	Elevado índice de polidispersividade (0,823)
<i>Diálise</i>	Baixo índice de polidispersividade (0,363)

No caso da evaporação de solvente, as nanopartículas formadas apresentaram elevada polidispersividade, demonstrando a presença de agregados de grandes dimensões. Pela técnica de “film sonification”, as soluções formadas não se apresentaram totalmente homogêneas após o processo. A análise DLS feita à posteriori confirmou a sedimentação de partículas, assim como grandes dimensões das mesmas.

Para o método da dissolução direta, as nanopartículas formadas apresentaram uma distribuição heterogênea do seu tamanho em função da intensidade, com picos de

intensidade para aproximadamente 165 d.nm e 240 d.nm. Desta forma, observou-se um valor elevado de polidispersividade (0,823).

O método de diálise mostrou-se como o mais promissor para a formação de nanopartículas micelares. Dos ensaios realizados o tamanho médio das partículas foi de  $(205,00 \pm 10,39)$  d.nm, com um índice de polidispersividade de 0,363.

Concluiu-se que a porfirina, Ce6, é o melhor fotossensibilizador, e que o método de diálise dá mais garantias na formação das nanopartículas. Além disso, o filtro PTFE de  $0,45 \mu\text{m}$  é o mais indicado para filtrar as soluções a serem analisadas por DLS.

### 4.2.2 Comportamento das nanopartículas à luz

O comportamento das nanopartículas após irradiação com laser de luz vermelha de  $80 \text{ mW/cm}^2$  e  $650 \text{ nm}$  foi avaliado de acordo com determinados parâmetros da análise de DLS em concordância com a literatura.

Um dos parâmetros está associado à variação do tamanho das partículas com a intensidade, como mencionado anteriormente. O tamanho para o qual a intensidade apresenta maior pico corresponderá ao tamanho médio das partículas [55]. Após a irradiação, comprova-se o fenômeno de *disassembly* se este pico se deslocar para a esquerda do eixo horizontal – relativo ao tamanho –, demonstrando a diminuição de tamanho médio das partículas.

Outro fator relaciona-se com o *Count Rate* (kcps). Este parâmetro, dado pelo *Zetasizer*, corresponde ao número médio de fótons por segundo que atinge o detector após interação com a amostra[56]. Mantendo o valor do atenuador, se o CR da solução diminuir uniformemente com o aumento do tempo de irradiação, então é possível afirmar que ocorreu o fenômeno de *disassembly* das nanopartículas pois existirão, em média, menos partículas a interagir com a luz [8].

Na Figura 25 estão apresentados os gráficos do *count rate* e do diâmetro das nanopartículas em função do tempo de irradiação para as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub> e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>, ambas encapsulando Ce6.

#### 4. Resultados e Discussão

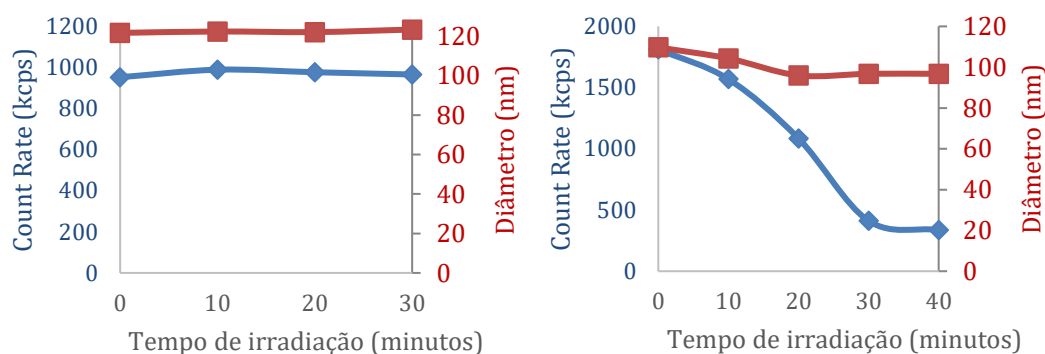


Figura 25 – Resultados de DLS para as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub> (esquerda) e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> (direita) como resposta à irradiação de luz vermelha. A curva a vermelho representa a variação do diâmetro em função do tempo de irradiação; a curva a azul representa a variação de CR com o tempo de exposição à luz vermelha.

A Figura 26 apresenta os mesmos gráficos, mas agora para as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub> e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub>, encapsulando Ce6.

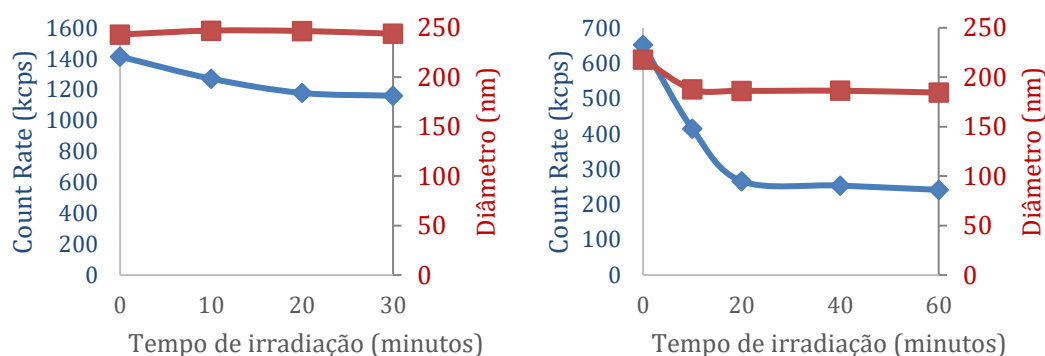


Figura 26 – Resultados de DLS para as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub> (esquerda) e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> (direita) como resposta à irradiação de luz vermelha. A curva a vermelho representa a variação do diâmetro em função do tempo de irradiação; a curva a azul representa a variação de CR com o tempo de exposição à luz vermelha.

A Figura 27 representa a taxa de *count rate* (%) a variar em função do tempo de irradiação para os nanopartículas fotossensíveis, PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub>.



#### 4. Resultados e Discussão

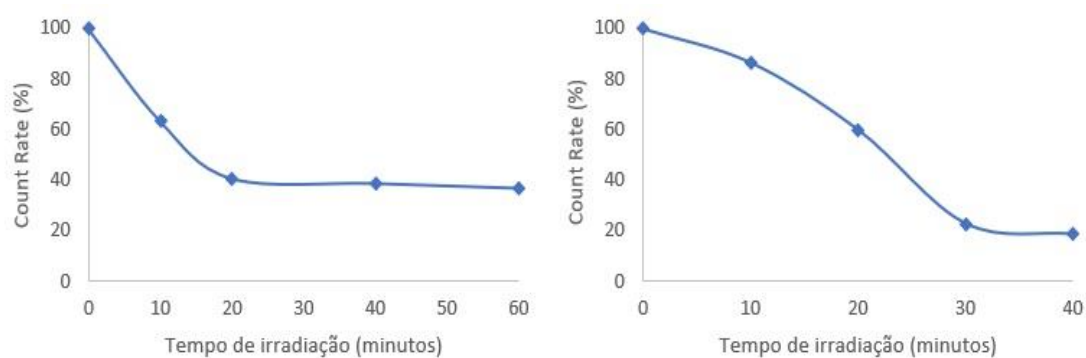


Figura 27 – Gráficos da variação da taxa de count rate em função do tempo de irradiação para as nanopartículas fotossensíveis, PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> (esquerda) e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> (direita).

Como é perceptível pelas figuras acima representadas, a partir do *count rate* medido por DLS temos a capacidade de monitorizar o processo de dissociação das nanopartículas causada pela irradiação. Em ambas as Figuras 25 e 26, o gráfico do lado esquerdo, representativo das nanopartículas sem segmento sensível ao oxigénio singuleto, apresenta uma estabilização da curva do *count rate* em função do tempo de irradiação. Já no gráfico do lado direito, onde as nanopartículas apresentam o segmento sensível, o *count rate* decresce com o aumento do tempo de irradiação, revelando o comportamento de desagregação das nanopartículas. De notar que este decréscimo é mais acentuado nos instantes iniciais, sofrendo uma estabilização com o decorrer do tempo. Este fator demonstra a rapidez de *disassembly* das nanopartículas após irradiação de luz vermelha com um laser de 650 nm, fator importante para a rápida libertação do fármaco.

Das Figuras 25 e 26 também é visível que o diâmetro das partículas em solução se mantém estável na ausência de segmento sensível nas nanopartículas. Já na presença de tal segmento, o tamanho médio das nanopartículas sofre um decréscimo, indicando que a irradiação provocou a desagregação de um número significativo de nanopartículas com o tamanho médio inicial [57].

Os gráficos fornecem ainda uma relação entre o peso molecular dos polímeros e o tamanho médio das nanopartículas. As nanopartículas de maior peso molecular (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> e PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub>) apresentam um diâmetro médio superior às de peso molecular mais baixo (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> e PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub>). Se para o primeiro caso, segundo a Figura 26, o diâmetro médio das nanopartículas ronda os 200 nm, para as nanopartículas de menor peso molecular, o diâmetro é de aproximadamente

#### 4. Resultados e Discussão

100 nm, como mostra o gráfico da Figura 25. Conclui-se que o aumento da parte hidrofóbica da micela leva a um aumento do seu núcleo, acompanhado pelo aumento do seu diâmetro [13].

Para além do *count rate*, o DLS permite relacionar a polidispersividade com o processo de dissociação. O aumento da PDI com o tempo de irradiação é mais uma prova de que as nanopartículas que apresentam o segmento sensível ao oxigénio singuleto se dissociam, dado que a solução vai conter mais partículas/agregados com uma gama mais alargada de dimensões [57].

A Tabela 8 apresenta a variação dos valores de PDI de acordo com o tempo de irradiação.

*Tabela 8 – Valores do índice de Polidispersividade (PDI) antes e após irradiação para os diferentes tipos de micelas quanto ao peso molecular e à presença e ausência do fragmento sensível ao oxigénio singuleto.*

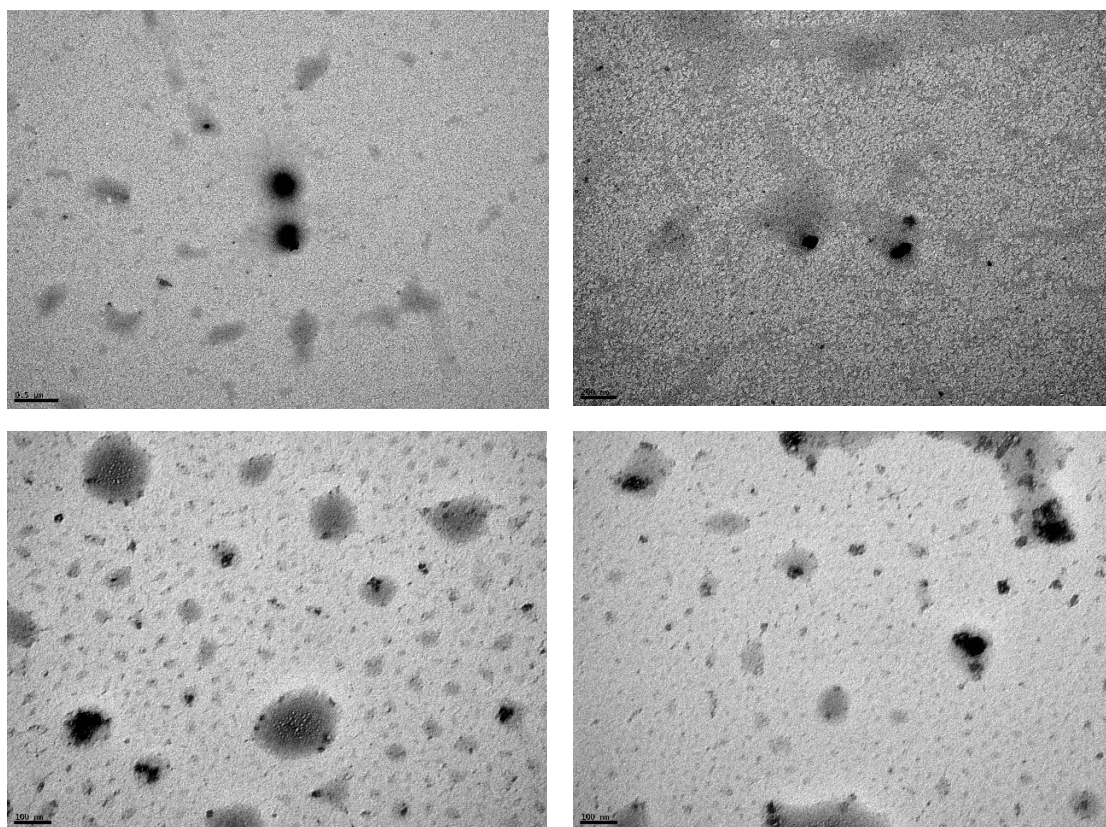
<b>Polímero</b>	<b>PDI (antes da irradiação)</b>	<b>PDI (após irradiação)</b>
<i>PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub></i>	0,260 ± 0,001	0,373 ± 0,017
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub></i>	0,254 ± 0,016	0,260 ± 0,001
<i>PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub></i>	0,084 ± 0,015	0,246 ± 0,024
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub></i>	0,223 ± 0,006	0,228 ± 0,011

Pelos valores presentes na tabela, verifica-se que PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> apresentou um aumento de aproximadamente 43% no índice de PDI enquanto que para PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> esse aumento foi superior a 100% - 193%. Estes dados comprovam a existência de *disassembly* após irradiação.

Outra evidência relaciona-se com a variação quase nula de PDI para as micelas onde não se encontra SegS. A variação ocorrida mantém-se dentro do desvio padrão apresentado, o que demonstra a manutenção da estrutura.

A alteração da forma e do tamanho das nanopartículas após irradiação também foi determinada por microscopia de transferência eletrónica (TEM). Nesta técnica, um feixe de eletrões é emitido na direção da amostra, interagindo com ela. Dessa interação resulta uma imagem ampliada da amostra. Para aumentar o contraste da imagem utilizou-se o acetato de uranilo. As imagens para as nanopartículas poliméricas PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> estão presentes na Figura 28.

#### 4. Resultados e Discussão



*Figura 28 – Imagens TEM das nanopartículas do tipo micelar. Agregados formados por self-assembly, antes da irradiação, com diâmetro aproximadamente 100 nm (em cima, escala a 0,5 μm e 200 nm respectivamente), e desagregados por ação da luz laser de 650 nm (em baixo, escala a 100 nm).*

As imagens TEM evidenciaram a morfologia esférica para as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>, apesar do tamanho obtido por TEM das mesmas ser ligeiramente menor que o medido por DLS. Após exposição à luz laser (650 nm, 80 mW cm<sup>-2</sup>, 2 h), a desagregação provocada pela luz visível foi confirmada por TEM, pela presença de desagregados irregulares do tipo micelar.

## 4. Resultados e Discussão

---

### 4.3 Determinação do CMC micelar

O CMC de um composto corresponde à menor concentração do composto em água de modo a ocorrer a formação de agregados de tipo micelar, sendo uma propriedade intrínseca ao material. É uma característica importante uma vez que nos permite saber qual a concentração a partir da qual a estrutura micelar vai ser formada [58]. A baixas concentrações em soluções aquosas, o composto anfifílico existe como monómeros em solução, mas quando a concentração do mesmo aumenta, ocorre o fenómeno de *self-assembly*, agregando-se e formando micelas [59].

Para determinar se o copolímero de bloco formou agregados de tipo micelar em água, examinou-se a sua capacidade de encapsulação de NR, usado como amostra hidrofóbica, recorrendo ao método de fluorescência. A escolha recaiu sob o NR devido ao seu comportamento singular na emissão de fluorescência, tanto em meios aquosos como não aquosos. Para além da sua baixa solubilidade na presença de água, quando é excitado por uma luz com 550 nm, num meio aquoso, emite uma fluorescência negligenciável com  $\lambda_{\max} = 660\text{nm}$ . Caso o corante se encontre em meio hidrofóbico, como é o interior das micelas, a intensidade de fluorescência aumenta substancialmente [6], [60].

Com os pressupostos acima explicados, observou-se ainda os valores de CMC para diferentes polímeros na literatura apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de Concentração Micelar Crítica (CMC) para as micelas do tipo PEG-PLA.

<b>Polímero</b>	<b>CMC</b>	<b>Referência</b>
<i>mPEG<sub>5k</sub>-(PD,LLA)<sub>2k</sub></i>	$4,5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$	[28]
<i>PEG<sub>2k</sub>-PLLA<sub>3k</sub></i>	$1,41 \times 10^{-6} \text{g/L}$	[60]
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLLA<sub>5k</sub></i>	$1,78 \times 10^{-3} \text{g/L}$	[61]
<i>PEG<sub>2k</sub>-PLA<sub>2k</sub></i>	$1,07 \times 10^{-4} \text{g/L}$	[62]

#### 4. Resultados e Discussão

O procedimento que possibilitou a caracterização do CMC das quatro nanopartículas baseou-se em A. P. Godwin [43] e está explicado no subcapítulo “Determinação da Concentração Micelar Crítica”.

Durante o procedimento, houve o cuidado de garantir que o corante não se acumulava nas paredes dos vials, de forma a que as concentrações se mantivessem minimamente inalteradas. Assegurou-se então que, das soluções preparadas, a consistência da amostra aumentava da menos concentrada para a de maior concentração de NR, ficando a solução cada vez mais turva, como mostra a Figura 29.



Figura 29 – Resultado final dos ensaios realizados com NR para obter o CMC das nanopartículas.

Os estudos de fluorescência foram realizados com o auxílio do espectrofotômetro de fluorescência *Perkin Elmer LS 45* e estão representados na Figura 30.

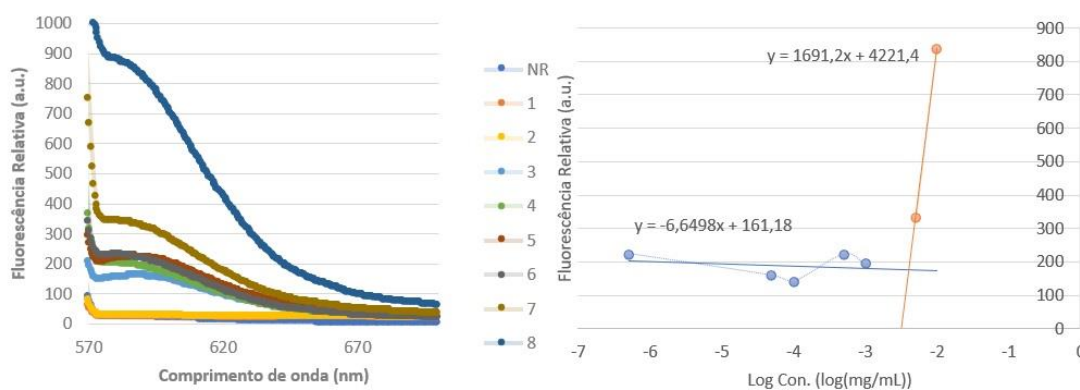


Figura 30 – A) Espectro de emissão de NR ( $\lambda_{exc} = 550 \text{ nm}$ ) para soluções com diferentes concentrações do polímero PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> em água. B) Intensidade de Fluorescência relativa a 580 nm em função do logaritmo da concentração (mg/mL) para o polímero.

O espectro de emissão de fluorescência da solução polimérica com NR excitado a 550 nm presente na Figura 30 A), demonstra um aumento de intensidade, acompanhado pelo aumento da concentração do polímero em solução. Esta evidência

#### 4. Resultados e Discussão

---

prova o fenômeno de *self-assembly*, com o corante a migrar para o interior do núcleo hidrofóbico da nanopartícula.

O valor de CMC foi determinado pela interseção das duas retas de tendência linear no gráfico da fluorescência relativa a 580 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em função do logaritmo da concentração (Figura 30 B)). A baixas concentrações, a fraca emissão indica que o NR está presente na água, e, portanto, poucas agregados micelares estão presentes em solução. O aumento da emissão provocado pelo aumento da concentração mostra a formação de agregados do tipo micelar [43].

Para cada polímero realizou-se 2 ensaios dos quais se retirou o valor do CMC. Esses valores estão apresentados na Tabela D1 do ANEXO D.

Os valores de CMC para os copolímeros de bloco PEG-PLA encontram-se todos dentro da ordem dos  $10^{-3}\text{M}$ , estando de acordo com a literatura que afirma que, para a relação entre o comprimento da cadeia polimérica de PEG e PLA, o CMC varia entre  $10^{-1}$  e  $10^{-3}$  [63]. Além disso, os valores de CMC para os copolímeros de bloco com e sem SegS traduzem o mesmo comportamento quanto à emissão de fluorescência do corante.

## 4. Resultados e Discussão

---



## 4.4 Determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas

A encapsulação do fármaco nas nanopartículas é tradicionalmente conseguida pela dissolução do mesmo e do polímero numa fase orgânica seguida de adição de água para que, com a evaporação do solvente orgânico, se formem as nanopartículas com o fármaco encapsulado. A escolha do fármaco a encapsular recaiu sobre a Dox HCl, dado ser um dos fármacos anti tumorais mais potentes, sendo usado em inúmeros tratamentos de diferentes tumores malignos [64], [65]. A DOX tem a capacidade de interagir com o DNA por intercalação e inibição da biossíntese macromolecular [66].

Para determinar a capacidade de encapsulação das nanopartículas seguiu-se o método de diálise. Neste método, após preparação das nanopartículas estas são colocadas em DMSO – usado com solvente devido à boa solubilidade dos polímeros, Ce6 e Dox HCl – e introduzidas numa membrana de diálise (MWCO 3500 Da). No exterior, a água destilada permite que ocorra um diferencial de concentrações. Assim, através da membrana semipermeável, o DMSO sairá do interior da membrana e a água destilada irá para o seu interior, de forma a igualar as concentrações. No momento em que se igualam as concentrações, inicia um equilíbrio na difusão, mantendo as trocas aquosas. Com o MWCO de 3500 Da (3500 g/mol), garante-se que as nanopartículas formadas pelos polímeros com peso molecular de 6000 g/mol ou 7000g/mol não passem pela membrana. A Dox e Ce6 conseguem passar para a solução exterior e ser quantificada.

Partindo de uma solução com 4,5 mg de Dox dissolvida em 1,045 mL de DMSO e 2,16 µL de TEA, outra com 6 mg de polímero dissolvido em 3 mL de DMSO e uma com 1 mg de Ce6 em 1 mL de DMSO, foram obtidas 6 amostras distintas, representadas na Tabela 10. A cada amostra é adicionado 1 mL de água-Mili-Q® e DMSO até perfazer 1 mL de DMSO em solução.

#### 4. Resultados e Discussão

Tabela 10 – Composição das amostras para determinação do DLC e DLE.

<b>Amostra</b>	<b>Dox (wt%)<sup>a</sup></b>	<b>Ce6<sup>b</sup></b>	<b>sol<sub>pol</sub> (µL)</b>
A	100	-	500
B	50	-	500
C	100	1:1 molar	500
D	50	1:1 molar	500
E	100	5 wt%	500
F	50	5 wt%	500

<sup>a</sup> Fração de massa da Dox em relação ao polímero; <sup>b</sup> Razão molar e Fração de massa da Ce6 em relação ao polímero

Esta tabela tem como propósito verificar, à posteriori, qual a influência da fração de massa (wt%) de Dox e do fotossensibilizador, Ce6, assim como da razão molar de Ce6 (1:1), em relação ao polímero, na capacidade de encapsulação das nanopartículas.

Depois de preparadas as soluções, as nanopartículas foram produzidas pelo método de diálise.

A análise da capacidade de encapsulação do fármaco pelas nanopartículas é realizada pela emissão de fluorescência a 589 nm no espectrofotômetro (*PerkinElmer* LS 45), como uma excitação a 480nm.

Para a medição da fluorescência da Dox que é encapsulada faz-se a adição do solvente orgânico, DMSO. Tendo em conta que a Dox existente em solução está encapsulada, não é possível ser detetada pela emissão de fluorescência. O DMSO serve para desagregar a estrutura micelar, libertando para a solução o fármaco encapsulado que emitirá fluorescência em meio hidrofílico.

Como mostra o gráfico da Figura 31, existe um pico de excitação de UV a 480nm, procedido por um máximo de emissão de fluorescência pela Dox. Este máximo é mais elevado para a curva da solução onde estão presentes 100 wt% de Dox e 1:1 molar de Ce6, sendo mais baixo para a curva representativa da solução que contém apenas 50 wt% de Dox.

Com a curva de calibração da Dox no solvente orgânico, DMSO, presente na Figura 32, obtém-se uma equação da reta de tendência linear que permitirá calcular o DLC e o DLE.

#### 4. Resultados e Discussão

Partindo da Figura 31, cada solução tem um comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência pela Dox.

Recorrendo à equação linear da curva de calibração da Dox em DMSO –  $y = 397855x - 11,527$ , onde  $y$  corresponde à intensidade (a.u.) e  $x$  à concentração presente na célula de quartzo – consegue-se obter a concentração da cuvete.

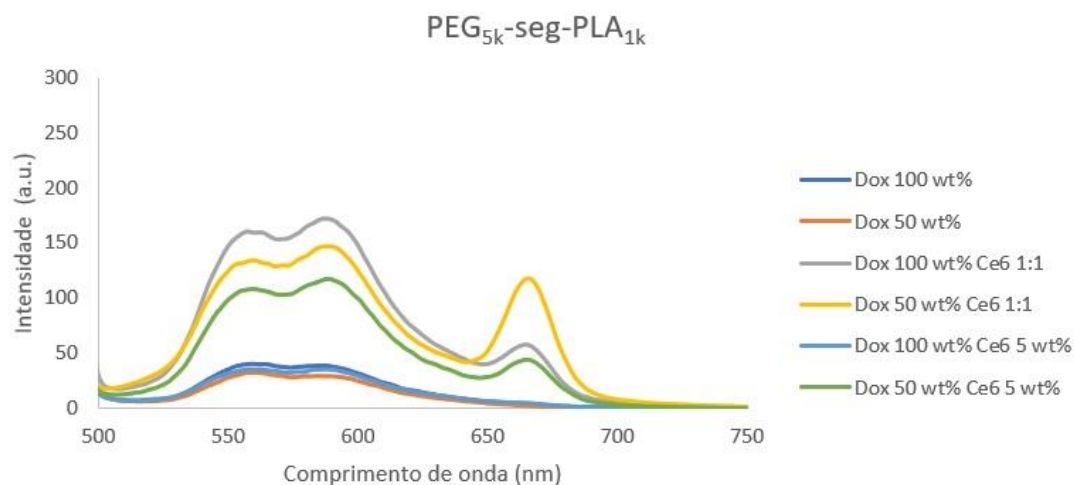


Figura 31 – Gráfico relativo às nanopartículas do copolímero de bloco  $PEG_{5k}$ -seg- $PLA_{1k}$  com pico de emissão a 589,5nm. Curvas relativas às diferentes amostras com diferentes porções de Dox e de Ce6, evidenciadas na margem direita do gráfico.

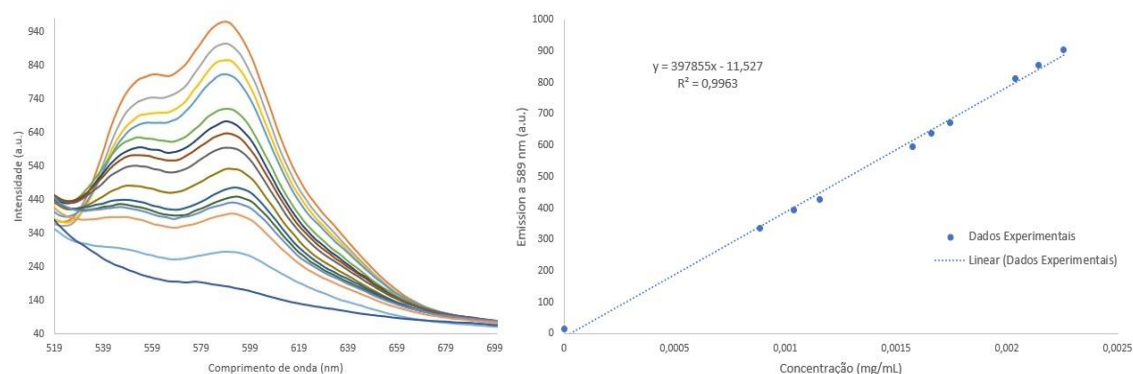


Figura 32 – Curva de calibração da Doxorrubicina em DMSO (direita) como resultado dos picos de emissão de intensidade máxima a 589nm para diferentes concentrações de Dox em DMSO (esquerda).

Considerando que a cuvete apresentava um volume total de 2 mL e que da solução com as nanopartículas apenas 100  $\mu$ L estavam presentes, o resultado obtido pela técnica de fluorescência, está presente na Tabela 11.

#### 4. Resultados e Discussão

*Tabela 11 – Resultados intensidade máxima a 589,5nm, que permite calcular os valores de concentração da cuvete através da reta linear de calibração da Dox em DMSO, bem como os valores de concentração da amostra. Daqui calcula-se os valores de DLC (%) e DLE (%) para as nanopartículas do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>.*

<i>amostra</i>	<b>Intensidade max. a 589,5nm</b>	<b>Concentração da cuvete (mg/mL)</b>	<b>Concentração da amostra (mg/ml)</b>	<b>DLC (%)</b>	<b>DLE (%)</b>
<i>A JF</i>	38,694549	0,000126231	0,002524616	0,403939	0,403939
<i>B JF</i>	29,131906	0,000102195	0,002043906	0,347464	0,694928
<i>C JF</i>	171,470293	0,00045996	0,009199195	1,563863	1,563863
<i>D JF</i>	146,009886	0,000395966	0,007919312	1,425476	2,850952
<i>E JF</i>	35,378092	0,000117895	0,002357899	0,400843	0,400843
<i>F JF</i>	117,042555	0,000323157	0,006463136	1,163365	2,326729

Desde logo verifica-se que os valores de DLC e DLE são abaixo de 5% - à semelhança das nanopartículas com cadeias de PLA de baixo peso molecular presentes na literatura. A eficiência mais baixa na encapsulação da Dox deve-se à presença de pouca quantidade de PLA nas nanopartículas. Com menos quantidade de PLA, menor será o grau de interação entre a Dox e o núcleo hidrofóbico, logo menor capacidade de encapsulação apresentarão as nanopartículas.

Também é visível que os valores de DLC e DLE são maiores na presença de maior quantidade de Ce6, mostrando que o fotossensibilizador não inibe a encapsulação da Dox.

De um modo geral, podemos concluir que a presença de Dox 100 wt% relativamente ao polímero e Ce6 numa razão 1:1 molar relativamente ao polímero constituem as melhores condições de encapsulação do fármaco.

Para as outras nanopartículas de pesos moleculares distintos, realizou-se o mesmo procedimento, tendo os resultados apresentado a mesma tendência, como mostra a tabela E1 do ANEXO E.

## 4.5 Estudo da libertação do fármaco pelas nanopartículas

Depois de analisada a capacidade de encapsulação das nanopartículas, procedeu-se à avaliação da libertação do fármaco na presença de luz visível na zona do vermelho.

Com a finalidade de alcançar perfis de libertação muito rápidos com tempos de exposição à luz mais curtos possíveis, realizou-se o estudo das nanopartículas que apresentavam melhores perfis de desintegração.

Para o efeito, estudaram-se a encapsulação dos dois polímeros pelo método de diálise. O primeiro conjunto de nanopartículas continha o polímero PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> e o segundo o polímero PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>, ambas contendo Dox e Ce6. Após a preparação das partículas procedeu-se à análise da sua desintegração pela técnica de DLS, executando as medições como anteriormente. Dispondo do *software Zetasizer*, avaliou-se o *count rate* de cada tipo de nanopartículas. À posteriori, esta avaliação permitiu comparar o nível de desintegração de ambas.

Ambas as nanopartículas contendo Dox foram irradiadas com um laser de luz vermelha a 650 nm durante 1, 2, 3 e 4 horas. Após cada irradiação, os valores de *count rate* foram registados.

O mesmo procedimento foi repetido, obtendo-se duas soluções semelhantes às anteriores, mas diferindo no tempo de irradiação, de forma a dispor de um perfil de desintegração para tempos de irradiação mais curtos. Para esta situação, irradiou-se as amostras durante 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos.

Finalizado os processos, construiu-se os gráficos da Figura 33.

#### 4. Resultados e Discussão

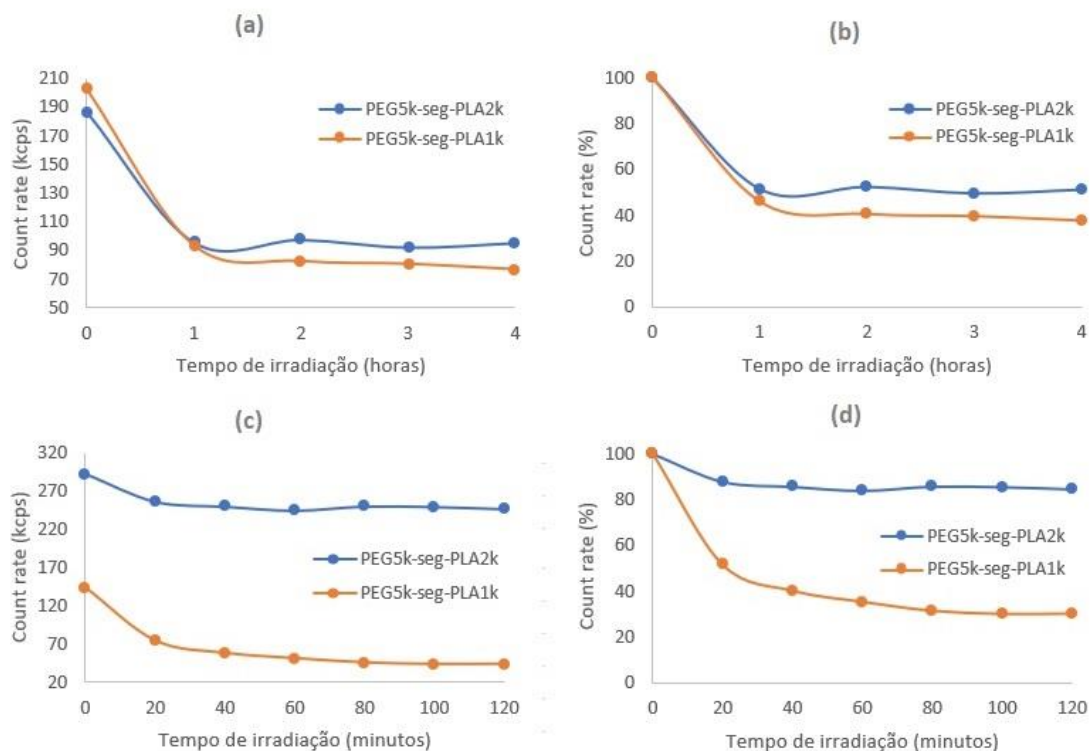


Figura 33 – Gráficos representativos da Variação do Count Rate (kcps) e da Taxa de Count Rate (%) com o tempo de irradiação para os polímeros PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> (curva a azul) e PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> (curva a laranja).

Analisando as curvas dos gráficos (a) e (b) na Figura 33, conclui-se que, para um tempo de irradiação mais alargado, a variação do *count rate* é semelhante para os dois polímeros em causa, apresentando uma queda acentuada na primeira hora, procedida por uma estabilização dos valores de *count rate*. Este perfil demonstra que o processo de destruição das nanopartículas é mais acentuado numa fase inicial. Noutro ensaio em que fizemos o controlo do tempo de irradiação para intervalos mais curtos obtivemos perfis semelhantes, ou seja, uma mais rápida degradação para as partículas produzidas com o polímero de menor peso molecular para o PLA [24].

Esta conclusão vai ao encontro do objetivo de se alcançar um perfil de libertação mais rápida para um tempo de exposição mais curto. Nesta experiência verificámos que uma capacidade de encapsulação mais elevada para o PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub> ( $DLC_{PEG5k-seg-PLA2k} = 8,26\%$ ) do que para o PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> ( $DLC_{PEG5k-seg-PLA1k} = 2,48\%$ ), no entanto, o estudo da libertação do fármaco foi realizado para o polímero de menor peso molecular com segmento sensível ao oxigénio singuleto.

#### 4. Resultados e Discussão

No procedimento, detalhado no subcapítulo “Estudos de liberação de material encapsulado após incidência de luz vermelha” dos “Materiais e Métodos”, a utilização do PBS como solvente deveu-se ao seu valor de pH semelhante ao pH fisiológico, 7,4 [48]. No que à temperatura diz respeito, o recurso ao banho-maria a 37°C durante a realização do ensaio promoveu a mimetização da temperatura do corpo humano.

Para além da amostra a testar fizemos um ensaio branco para efeitos de comparação, no qual não houve qualquer irradiação ficando à luz natural. A amostra foi irradiada durante 2 horas por um laser de 650 nm.

O mecanismo de diálise presente leva à passagem da solução para o exterior do saco de diálise com fluxo contrário de PBS, desencadeado pela diferença de concentrações. Desta forma, ao retirar 2mL do vial num determinado intervalo de tempo, avalia-se a cinética de liberação da Dox no processo de diálise até então.

A quantidade de Dox libertada foi medida pela emissão de fluorescência, após excitação a 480nm.

Após a aquisição dos dados, são obtidos os gráficos da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda, como mostra a Figura 34.

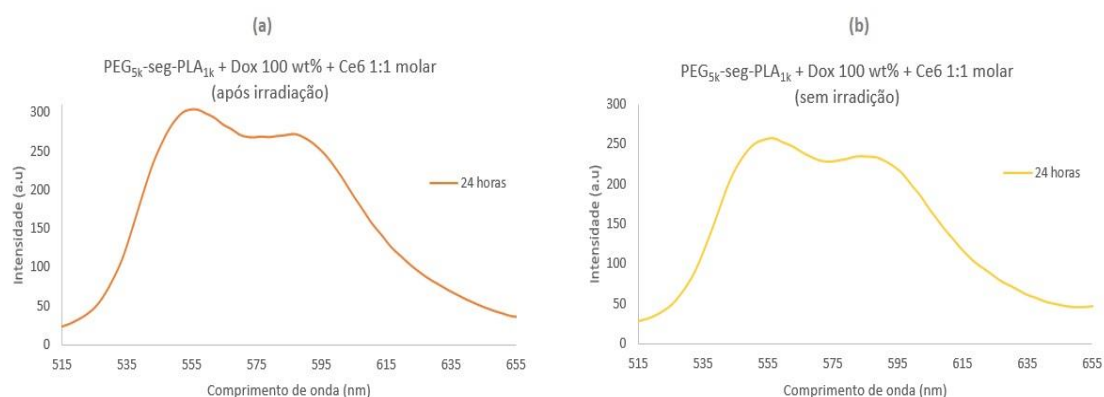


Figura 34 – Gráficos representativos da emissão de fluorescência da doxorubicina encapsulada no núcleo das nanopartículas sob irradiação de  $\lambda = 650$  nm.

Como seria de esperar, as nanopartículas onde está presente o fotossensibilizador, sujeitas a irradiação, apresentam picos de intensidade mais elevados em relação às nanopartículas sem irradiação. Para estas que apenas tinham a Dox apresentaram picos de intensidade, inferiores ao ensaio anterior em todos os tempos de análise. Para os instantes finais, os valores observados no gráfico (b)

#### 4. Resultados e Discussão

resultam de doxorrubicina que irá saindo naturalmente das nanopartículas seguindo o gradiente de concentração.

Com os resultados da fluorescência calculou-se a quantidade de Dox libertada ao fim das 24 horas. À semelhança da calibração da Dox em DMSO, é necessário também em PBS, de forma a retirar-se uma equação da reta de tendência linear. A calibração da Dox em PBS está evidenciada na Figura 35.

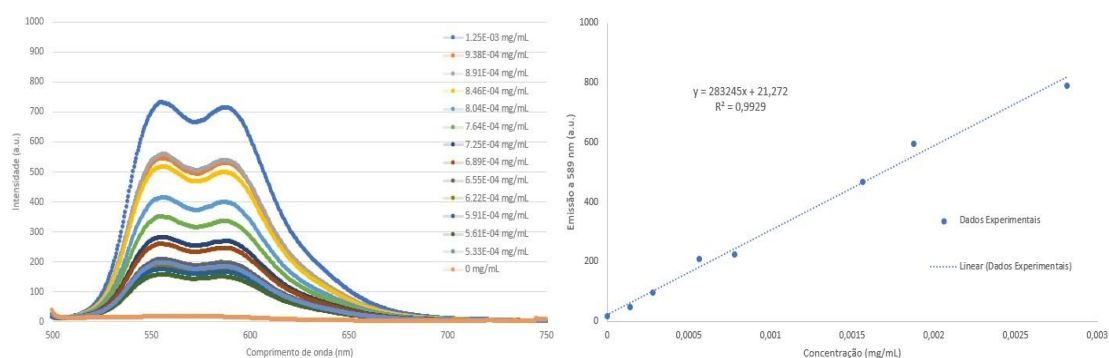


Figura 35 – Curva de calibração da Doxorrubicina em PBS (direita) como resultado dos picos de emissão de intensidade máxima a 589 nm para diferentes concentrações de Dox em PBS (esquerda).

Os valores percentuais da cinética de libertação para as duas amostras, partindo da concentração de Dox 24 horas após a irradiação, estão apresentados na Tabela 12, onde (A) corresponde à amostra (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (após irradiação)) e (B) à amostra (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (sem irradiação)).

Tabela 12 – Valores percentuais da cinética de libertação da doxorrubicina para as diferentes amostras 24 horas após irradiação. (A) – PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (após irradiação); (B) – PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (sem irradiação).

<i>Instante</i>	Cinética de Libertação de Dox (%)	Cinética de Libertação de Dox (%)
	(A)	(B)
24 horas	32,28481	14,50081

Com estes valores constrói-se um gráfico característico do perfil da cinética de libertação da Dox pelas nanopartículas, como mostra a Figura 36.



#### 4. Resultados e Discussão

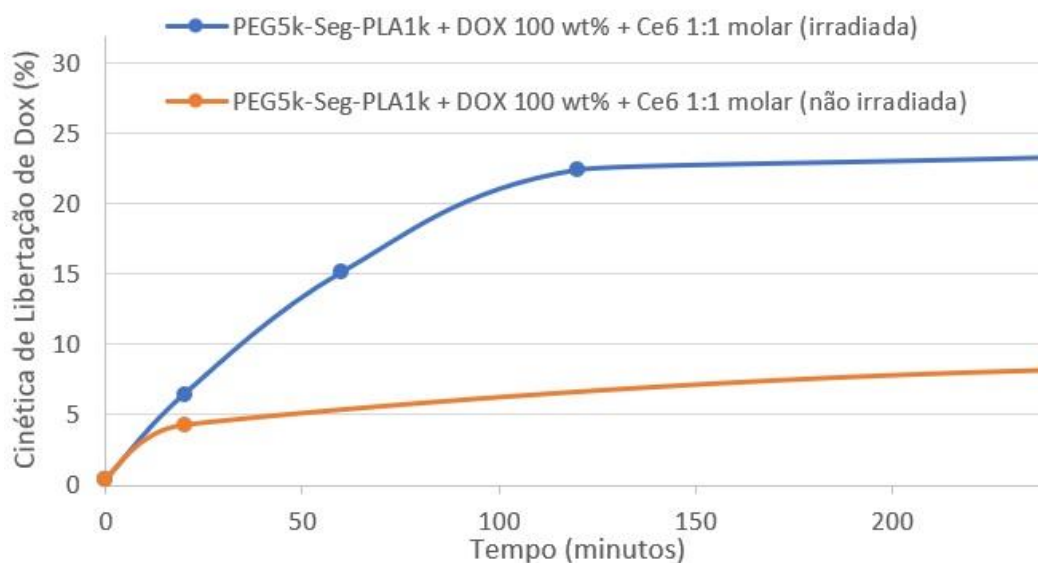


Figura 36 – Gráfico representativo da cinética de liberação da Dox para os diferentes intervalos de tempo representados no eixo horizontal. Cada curva pertence aos diferentes tipos de micela, como descrito na legenda do gráfico.

O gráfico da Figura 36 justifica as conclusões anteriormente referidas, mostrando maior cinética de liberação para as micelas irradiadas com fotossensibilizador.

Com o intuito de conseguir mais elementos de modo a melhor entender o processo de liberação da doxorubicina das nanopartículas, fizemos mais 2 ensaios para as nanopartículas PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> onde se variou a concentração de Dox (50/100 wt%) e Ce6 (1:1 molar/5 wt%), de forma a observar a influência da quantidade do fármaco e do fotossensibilizador na liberação. O procedimento e a aquisição dos dados foram análogos ao anteriormente implementado.

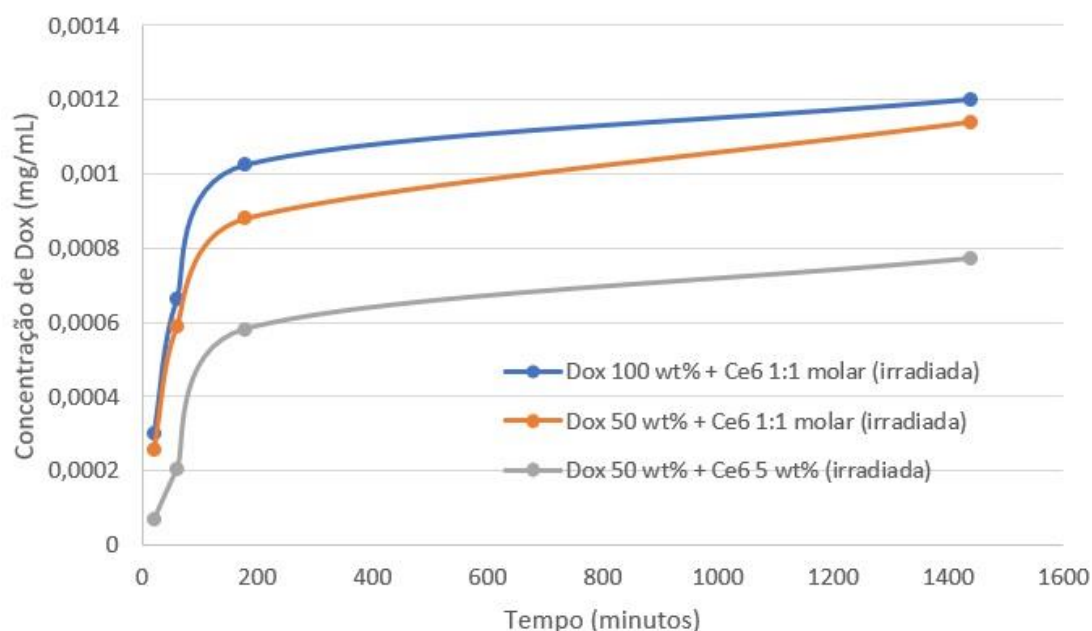
Por consequência, pela equação da reta de calibração da Dox em PBS, determinou-se as concentrações de Dox em solução 24 horas após irradiação, de acordo com o  $\lambda_{\text{max}}$  de emissão de fluorescência da Dox e sabendo que, em cada instante, eram retirados 2 mL de PBS em torno da membrana de diálise e colocada a mesma quantidade de PBS para manter os 5 mL iniciais. Desta foram, obtiveram-se os valores da Tabela 13, onde (A) corresponde à amostra (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (irradiada)), (B) à amostra (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 50 wt% + Ce6 1:1 molar (irradiada)) e (C) à amostra (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 50 wt% + Ce6 5 wt% (irradiada)).

#### 4. Resultados e Discussão

*Tabela 13 – Concentração de doxorrubicina libertada para as diferentes amostras 24 horas após irradiação. (A) – (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 100 wt% + Ce6 1:1 molar (irradiada)); (B) – (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 50 wt% + Ce6 1:1 molar (irradiada)); (C) – (PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> + Dox 50 wt% + Ce6 5 wt% (irradiada)).*

<i>Instantes</i>	<b>Concentração de Dox libertada (mg/mL)</b> <b>(A)</b>	<b>Concentração de Dox libertada (mg/mL)</b> <b>(B)</b>	<b>Concentração de Dox libertada (mg/mL)</b> <b>(C)</b>
24 horas	$1,20 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^{-3}$	$7,71 \times 10^{-4}$

Com estes valores obteve-se o gráfico da Figura 37. A inexistência de um valor da concentração de Dox libertada para o instante inicial, 0 minutos, não foi retirado. Porém, como a tendência dos valores não se altera, o ensaio mantém-se viável.



*Figura 37 – Gráfico representativo da cinética de liberação da Dox no processo de dialise, através da variação da concentração de Dox medida fora das nanopartículas em função tempo (minutos) para as micelas PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub> de composições distintas quanto ao fotossensibilizador e fármaco.*

O gráfico da figura mostra que, para a mesma concentração de Ce6, o aumento de wt% da doxorrubicina é pouco significativo para a concentração de fármaco que é libertada. Já o aumento da concentração de Ce6, mantendo a concentração de fármaco em solução, aumenta a concentração de doxorrubicina libertada, revelando maior capacidade na produção de oxigénios singuletos e conseqüentemente degradação das nanopartículas.

## 5 Conclusões e Trabalho Futuro

Ao longo deste trabalho foram preparados, por polimerização por abertura de anel (ROP), quatro copolímeros de bloco PEG-PLA, com pesos moleculares de PLA distintos e apresentando um segmento sensível ao oxigénio singuleto em dois deles. A análise química (análise SEC/GPC e  $^1\text{H}$  RMN) realizada aos polímeros confirmou o sucesso na sua síntese.

A formação das nanopartículas, partindo dos copolímeros de bloco, foi realizada pelo método de diálise. O sucesso na sua formação foi corroborado pela análise DLS, usando a baixa polidispersividade e as dimensões das nanopartículas como parâmetros de avaliação. Também por análise DLS se avaliou o comportamento das nanoestruturas com a radiação acima dos 600 nm, tendo sido observado a degradação das mesmas através da diminuição do *count rate*. Com a resposta das nanopartículas à luz na zona do vermelho como estímulo externo, desenvolveu-se um sistema de libertação controlada de fármacos. Concluindo-se que os copolímeros de bloco formaram nanopartículas do tipo micelar para um valor de concentração na ordem dos  $10^{-3}\text{M}$ . Avaliou-se a capacidade de encapsulação e libertação das nanopartículas. A análise da capacidade de encapsulação das nanopartículas formadas permitiu observar a influência da quantidade de fármaco e de fotossensibilizador encapsulado. Assim, concluiu-se que, a maior presença de Ce6, em nanopartículas com uma fração de massa de Dox em relação ao polímero de 100 wt%, permite aumentar o DLC e o DLE das nanopartículas. No entanto estes parâmetros apresentaram-se abaixo dos 5%. Quanto à capacidade de libertação de Dox, as nanopartículas do tipo PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>1k</sub>, evidenciaram uma maior taxa na cinética de libertação da Dox para os instantes iniciais, havendo uma estabilização com o aumento do tempo após irradiação. Este fator constituiu uma característica importante para as nanopartículas deste tipo, dado que para sistemas de libertação controlada de fármacos é imperativo que a libertação ocorra a uma velocidade mais rápida para os instantes iniciais, tornando o sistema mais eficaz.

Com este trabalho, através da encapsulação do fármaco numa nanoestrutura, é possível prever uma diminuição da toxicidade do produto, permitindo a sua circulação

até ao local de interesse sem efeitos colaterais. Além disso, uma vez que se obtiveram nanopartículas com resultados promissores no âmbito da terapia fotodinâmica, o próximo passo terá que passar pela realização dos estudos *in vitro* com células tumorais para a libertação da Dox.

Seria interessante verificar se a funcionalização da cadeia hidrofóbica de PLA em relação ao seu tamanho e na sua composição química poderia afetar a encapsulação e a libertação do fármaco, dada a sua interação com o fármaco. Também a funcionalização na ligação entre o fragmento sensível ao oxigénio singuleto e o fotossensibilizador seria um aspeto a rever dado o tempo de vida curto dos singuletos.

## 6 Referências Bibliográficas

- [1] F. Masood, “Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, pp. 569–578, Mar. 2016.
- [2] J. Lee, J. Park, K. Singha, and W. J. Kim, “Mesoporous silica nanoparticle facilitated drug release through cascade photosensitizer activation and cleavage of singlet oxygen sensitive linker,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 15, p. 1545, 2013.
- [3] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, “Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices,” *J Control Release*, 2001.
- [4] M. Hans, K. Shimoni, D. Danino, S. Siegel, and a, “Synthesis and Characterization of mPEG– PLA Prodrug Micelles,” *Biomacromolecules*, pp. 2708–2717, 2005.
- [5] J. Panyam and V. Labhasetwar, “Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 329–347, 2003.
- [6] Y. Li, K. Xiao, W. Zhu, W. Deng, and K. S. Lam, “Stimuli-responsive cross-linked micelles for on-demand drug delivery against cancers,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 66, pp. 58–73, 2014.
- [7] X. Zhang, Y. Lin, and R. J. Gillies, “Tumor pH and Its Measurement,” *J. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 8, pp. 1167–1170, 2010.
- [8] P. Han *et al.*, “Red light responsive diselenide-containing block copolymer micelles,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 6, pp. 740–743, 2013.
- [9] P. Han *et al.*, “Red light responsive diselenide-containing block copolymer micelles,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 6, pp. 740–743, 2013.
- [10] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, “Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 4, pp. 279–293, 2004.
- [11] G. Liu, W. Liu, and C. M. Dong, “UV- and NIR-responsive polymeric nanomedicines for on-demand drug delivery,” *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 12, pp. 3431–3443, 2013.
- [12] G. Saravanakumar, J. Lee, J. Kim, and W. J. Kim, “Visible light-induced singlet oxygen-mediated intracellular disassembly of polymeric micelles co-loaded with a photosensitizer and an anticancer drug for enhanced photodynamic therapy,” *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 49, pp. 9995–9998, 2015.
- [13] K. Zhang *et al.*, “PEG-PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications,” *J. Control. Release*, vol. 183, no. 1, pp. 77–86, 2014.
- [14] K. Letchford and H. Burt, “A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, no. 3, pp. 259–269, 2007.

- [15] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. MacKiewicz, and P. Couvreur, "Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 3, pp. 1147–1235, 2013.
- [16] C. Tan, Y. Wang, and W. Fan, "Exploring polymeric micelles for improved delivery of anticancer agents: Recent developments in preclinical studies," *Pharmaceutics*, vol. 5, no. 1, pp. 201–219, 2013.
- [17] M. J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, and S. D. Li, "Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 172, no. 3, pp. 782–794, 2013.
- [18] A. Kolate, D. Baradia, S. Patil, I. Vhora, G. Kore, and A. Misra, "PEG - A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 192, pp. 67–81, 2014.
- [19] Y. Lu and K. Park, "Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs," *Int. J. Pharm.*, vol. 453, no. 1, pp. 198–214, 2013.
- [20] J. Li, S. Guo, M. Wang, L. Ye, and F. Yao, "Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) block copolymer based shell or core cross-linked micelles for controlled release of hydrophobic drug," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 25, pp. 19484–19492, 2015.
- [21] A. B. Ebrahim Attia *et al.*, "Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 182–194, 2011.
- [22] G. Gaucher, M. H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J. C. Leroux, "Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 109, no. 1–3, pp. 169–188, 2005.
- [23] S. A. Hagan *et al.*, "Polylactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems. 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems," *Langmuir*, vol. 12, no. 9, pp. 2153–2161, 1996.
- [24] K. Jelonek, S. Li, X. Wu, J. Kasperczyk, and A. Marcinkowski, "Self-assembled filomicelles prepared from polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers for anticancer drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 485, no. 1–2, pp. 357–364, 2015.
- [25] N. Nasongkla *et al.*, "Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems," *Nano Lett.*, vol. 6, no. 11, pp. 2427–2430, 2006.
- [26] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, and R. M. Filho, "Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 1, pp. 321–328, 2012.
- [27] A. P. Gupta and V. Kumar, "New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique," *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 10, pp. 4053–4074, 2007.
- [28] C. Garofalo *et al.*, "Different insight into amphiphilic PEG-PLA copolymers: Influence of macromolecular architecture on the micelle formation and cellular uptake," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 1, pp. 403–415, 2014.
- [29] Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai, "PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: Invitro and invivo characterizations," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 5, 2009.
- [30] H. Qian, A. R. Wohl, J. T. Crow, C. W. Macosko, and T. R. Hoye, "A Strategy

- for Control of “Random” Copolymerization of Lactide and Glycolide: Application to Synthesis of PEG-b-PLGA Block Polymers Having Narrow Dispersion,” *Macromolecules*, vol. 44, no. 18, pp. 7132–7140, 2011.
- [31] N. Rapoport, “Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 962–990, 2007.
- [32] D. Roy, J. N. Cambre, and B. S. Sumerlin, “Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 1–2, pp. 278–301, 2010.
- [33] A. Jhaveri, P. Deshpande, and V. Torchilin, “Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy,” *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 352–370, 2014.
- [34] W. Wang, J. Lin, C. Cai, and S. Lin, “Optical properties of amphiphilic copolymer-based self-assemblies,” *Eur. Polym. J.*, vol. 65, pp. 112–131, 2015.
- [35] I. Tomatsu, K. Peng, and A. Kros, “Photoresponsive hydrogels for biomedical applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 14–15, pp. 1257–1266, 2011.
- [36] W. M. Sharman, C. M. Allen, and J. E. Van Lier, “Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 4, no. 11, pp. 507–517, 1999.
- [37] T. Dai *et al.*, “Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform,” *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. APR, pp. 1–16, 2012.
- [38] S. Yano *et al.*, “Current states and future views in photodynamic therapy,” *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 46–67, 2011.
- [39] M. O. Senge and M. W. Radomski, “Platelets, photosensitizers, and PDT,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, 2013.
- [40] J. M. Schumers, C. A. Fustin, and J. F. Gohy, “Light-responsive block copolymers,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, no. 18, pp. 1588–1607, 2010.
- [41] S. D. P. Baugh, Z. Yang, D. K. Leung, D. M. Wilson, and R. Breslow, “Cyclodextrin dimers as cleavable carriers of photodynamic sensitizers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 50, pp. 12488–12494, 2001.
- [42] L. Yang, X. Qi, P. Liu, A. El Ghzaoui, and S. Li, “Aggregation behavior of self-assembling polylactide/poly(ethylene glycol) micelles for sustained drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 394, no. 1–2, pp. 43–49, 2010.
- [43] A. P. Goodwin, J. L. Mynar, Y. Ma, G. R. Fleming, and J. M. J. Fréchet, “Synthetic micelle sensitive to IR light via a two-photon process,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 28, pp. 9952–9953, 2005.
- [44] S. L. Pal, U. Jana, P. K. Manna, G. P. Mohanta, and R. Manavalan, “Nanoparticles—An Overview of Preparation and Characterization,” *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 6, pp. 228–234, 2011.
- [45] S. Puntawee *et al.*, “Solubility enhancement and in vitro evaluation of PEG-b-PLA micelles as nanocarrier of semi-synthetic andrographolide analogue for cholangiocarcinoma chemotherapy,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 21, no. 4, pp. 437–444, 2016.
- [46] L. Yang, X. Wu, F. Liu, Y. Duan, and S. Li, “Novel biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs,” *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 10, pp. 2332–2342, 2009.
- [47] W. Y. Ayen, K. Garkhal, and N. Kumar, “Doxorubicin-loaded (PEG)3-PLA nanopolymerosomes: Effect of solvents and process parameters on formulation

- development and in vitro study,” *Mol. Pharm.*, vol. 8, no. 2, pp. 466–478, 2011.
- [48] L. Dai *et al.*, “Biomaterials Photosensitizer enhanced disassembly of amphiphilic micelle for ROS-response targeted tumor therapy in vivo,” *Biomaterials*, vol. 104, pp. 1–17, 2016.
- [49] L. Meng, W. Huang, D. Wang, X. Huang, X. Zhu, and D. Yan, “Chitosan-based nanocarriers with pH and light dual response for anticancer drug delivery,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 8, pp. 2601–2610, 2013.
- [50] P. P. Datta and M. K. Kiesewetter, “Controlled Organocatalytic Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Thionocaprolactone,” *Macromolecules*, vol. 49, no. 3, pp. 774–780, 2016.
- [51] “Molecular Characterization of Copolymers and Polymer Blends | Polyanalytik.” [Online]. Available: <https://polyanalytik.com/resource-centre/theory/molecular-characterization-of-copolymers-and-polymer-blends>. [Accessed: 27-Jul-2018].
- [52] Li Y and Barron AR, “Dynamic Light Scattering - Nanomaterials and Nanotechnology - OpenStax CNX.” [Online]. Available: <https://cnx.org/contents/e038-LKO@13.7:P8mNrZNN@2/Dynamic-Light-Scattering>. [Accessed: 03-Aug-2018].
- [53] H.-A. Kim, J.-K. Seo, T. Kim, and B.-T. Lee, “Nanometrology and its perspectives in environmental research,” *Environ. Health Toxicol.*, vol. 29, p. e2014016, 2014.
- [54] “Linha Zetasizer Nano para DLS, ELS, SLS e microrreologia.” [Online]. Available: <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/index.html>. [Accessed: 04-Aug-2018].
- [55] H. Sun, B. Guo, R. Cheng, F. Meng, H. Liu, and Z. Zhong, “Biodegradable micelles with sheddable poly(ethylene glycol) shells for triggered intracellular release of doxorubicin,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 31, pp. 6358–6366, 2009.
- [56] “Derived count rate - mean scattering intensity - Zetasizer.” [Online]. Available: <http://www.materials-talks.com/blog/2015/06/11/derived-count-rate-what-is-it/>. [Accessed: 06-Aug-2018].
- [57] G.-Y. Liu, C.-J. Chen, D.-D. Li, S.-S. Wang, and J. Ji, “Near-infrared light-sensitive micelles for enhanced intracellular drug delivery,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 33, p. 16865, 2012.
- [58] Z. Sezgin, N. Yüksel, and T. Baykara, “Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 64, no. 3, pp. 261–268, 2006.
- [59] C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J. F. W. Nijssen, and W. E. Hennink, “Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered release,” *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 12, pp. 2569–2589, 2010.
- [60] A. Ouahab, N. Cheraga, V. Onoja, Y. Shen, and J. Tu, “Novel pH-sensitive charge-reversal cell penetrating peptide conjugated PEG-PLA micelles for docetaxel delivery: In vitro study,” *Int. J. Pharm.*, vol. 466, no. 1–2, pp. 233–245, 2014.
- [61] X. Xu, X. Zhang, X. Wang, Y. Li, and X. Jing, “Comparative study of paclitaxel physically encapsulated in and chemically conjugated with PEG-PLA,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 20, no. 11, pp. 843–848, 2009.
- [62] Z. Fan *et al.*, “Adding vitamin E-TPGS to the formulation of genexol-pm: Specially mixed micelles improve drug-loading ability and cytotoxicity against



- multidrug-resistant tumors significantly,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, pp. 1–17, 2015.
- [63] Z. Hami, M. Amini, M. Ghazi-Khansari, S. M. Rezayat, and K. Gilani, “Synthesis and in vitro evaluation of a pH-sensitive PLA-PEG-folate based polymeric micelle for controlled delivery of docetaxel,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 116, pp. 309–317, 2014.
- [64] M. L. Adams, A. Lavasanifar, and G. S. Kwon, “Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery,” vol. 92, no. 7, pp. 1343–1355, 2003.
- [65] A. Akinc, D. G. Anderson, D. M. Lynn, and R. Langer, “Synthesis of poly(beta-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery.,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 14, no. 5, pp. 979–88, 2003.
- [66] D. A. Gewirtz, “A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 57, no. 7, pp. 727–741, 1999.

## Referências Bibliográficas

---

# Anexos

## Anexo A: Síntese do polímero PEG-PLA

Cálculo da massa do *rac*-lactide usada:

$$M_{nTeórico} = \frac{Massa_{molarPLA} \times n_{monómero}}{n_{iniciador}} + M_{iniciador},$$

onde  $M_{nTeórico} = M_{wPEG} + M_{wPLA}$  ,  $Massa_{molarPLA} = 72g/mol$  ,  
 $n_{iniciador} = \frac{1}{5000} g/mol$  ,  $M_{iniciador} = M_{wPEG}$  e  $M_{wmonómero} = M_{wrac-LA} = 144,13g/mol$ .

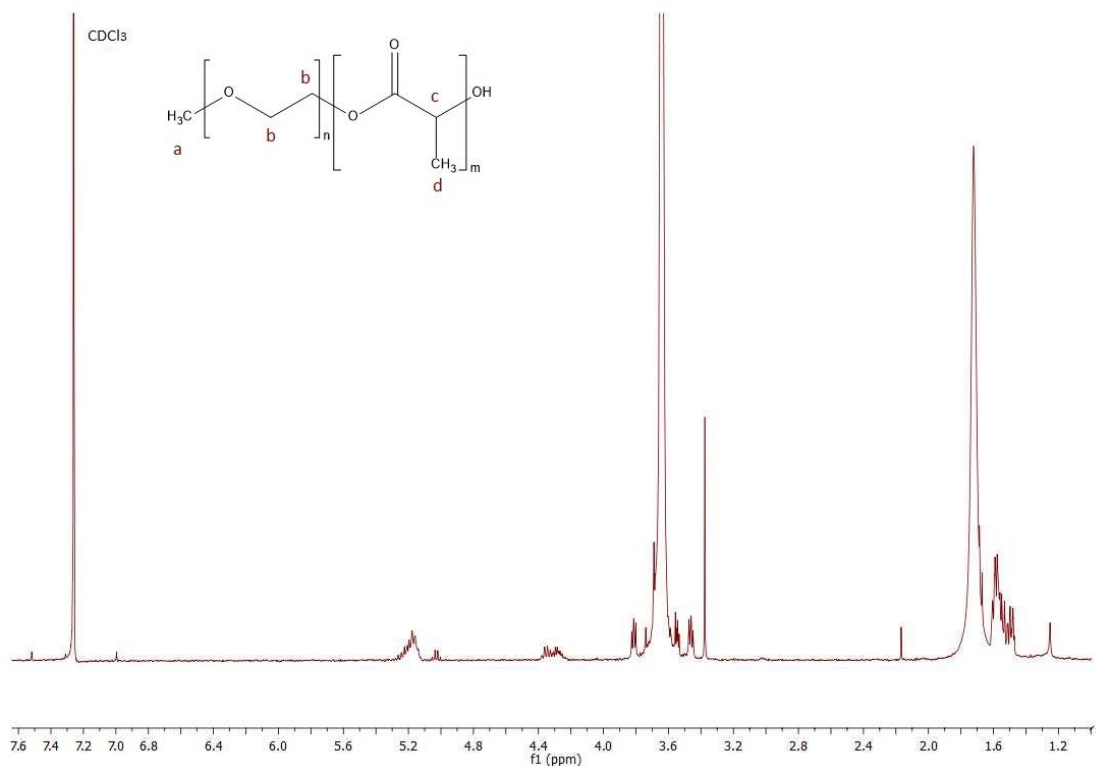


Figura A1 – Espectro <sup>1</sup>H NMR como resultado da síntese do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub>, em CDCl<sub>3</sub>.

## Anexo B: Determinação do DN/DC

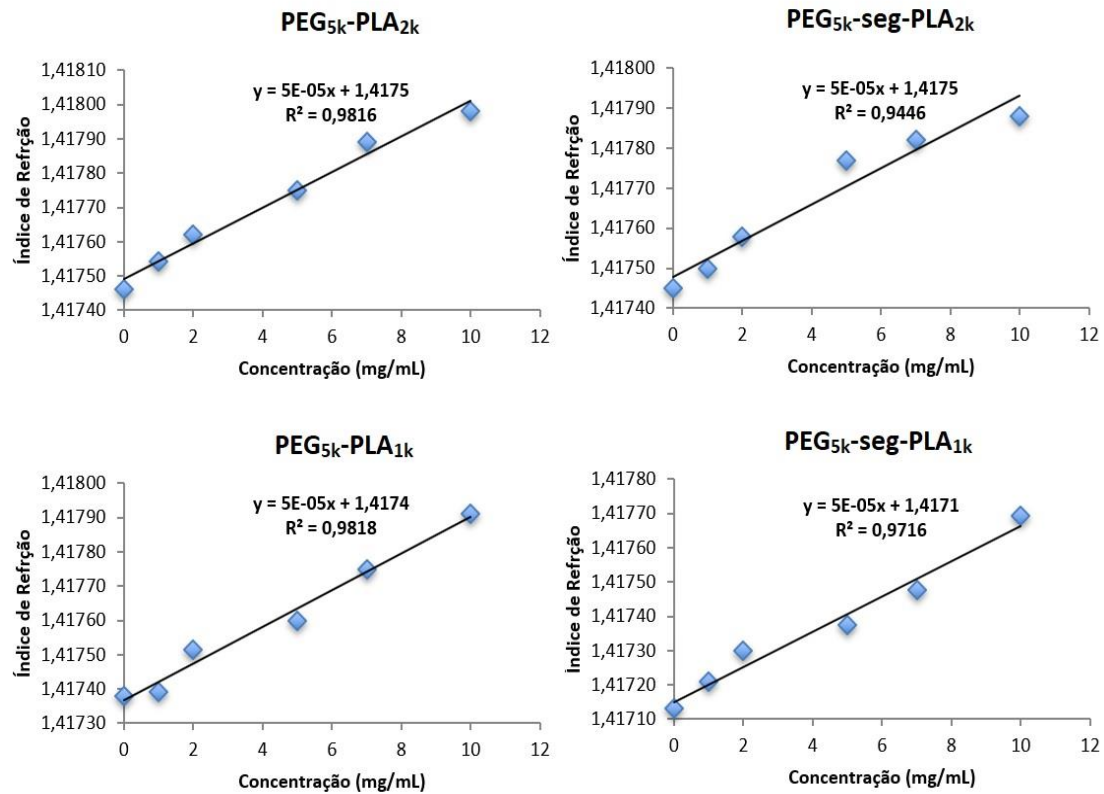


Figura B1 – Gráficos do Índice de refração em função da concentração (mg/mL) para cada um dos polímeros. O declive corresponde ao valor de  $dn/dc$ .

Equação para o  $(dn/dc)$  do copolímero:

$$\left(\frac{dn}{dc}\right) = \left[ \frac{c_{PLA}}{c_{PLA} + c_{PEG}} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)_{PLA} \right] + \left[ \frac{c_{PEG}}{c_{PLA} + c_{PEG}} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)_{PEG} \right]$$

$$\left(\frac{dn}{dc}\right)_{PLA} = 0,0558$$

$$\left(\frac{dn}{dc}\right)_{PEG} = 0,0550$$

$c_{PLA}, c_{PEG}$  = Fração de PEG e PLA em solução

## Anexo C: Síntese do polímero PEG-seg-PLA

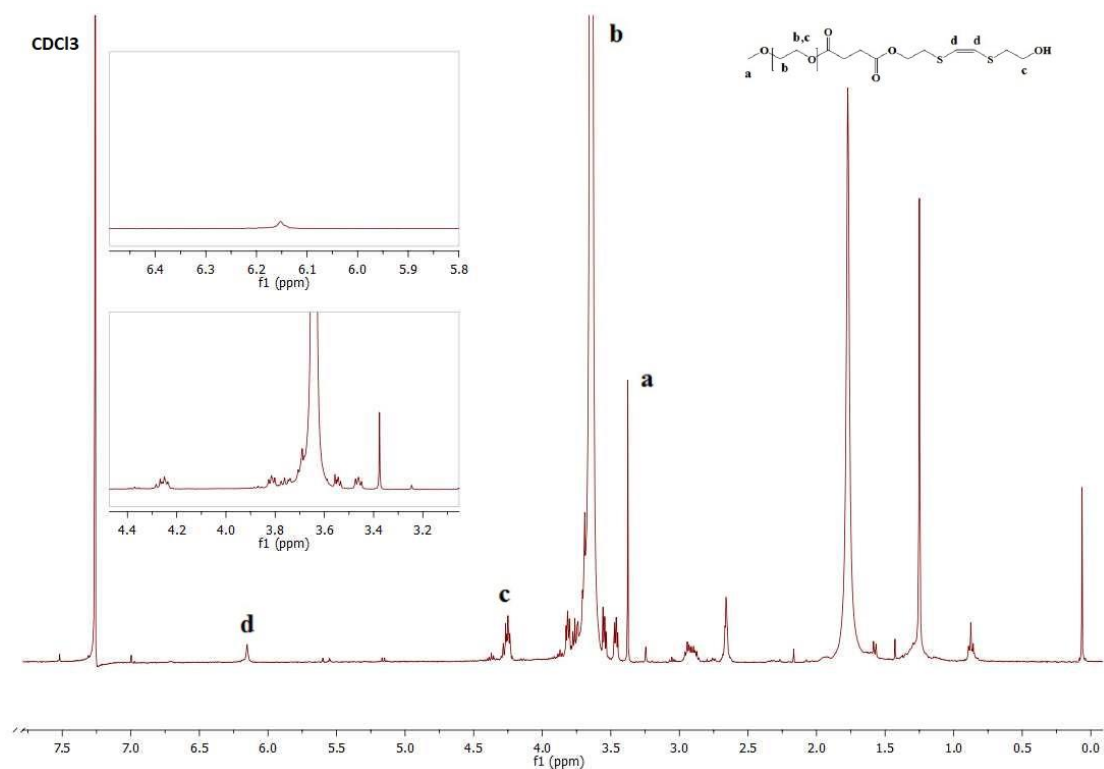


Figura C1 – Espectro  $^1\text{H}$  NMR como resultado da síntese do macroiniciador PEG-COOSegSOH, em  $\text{CDCl}_3$ .

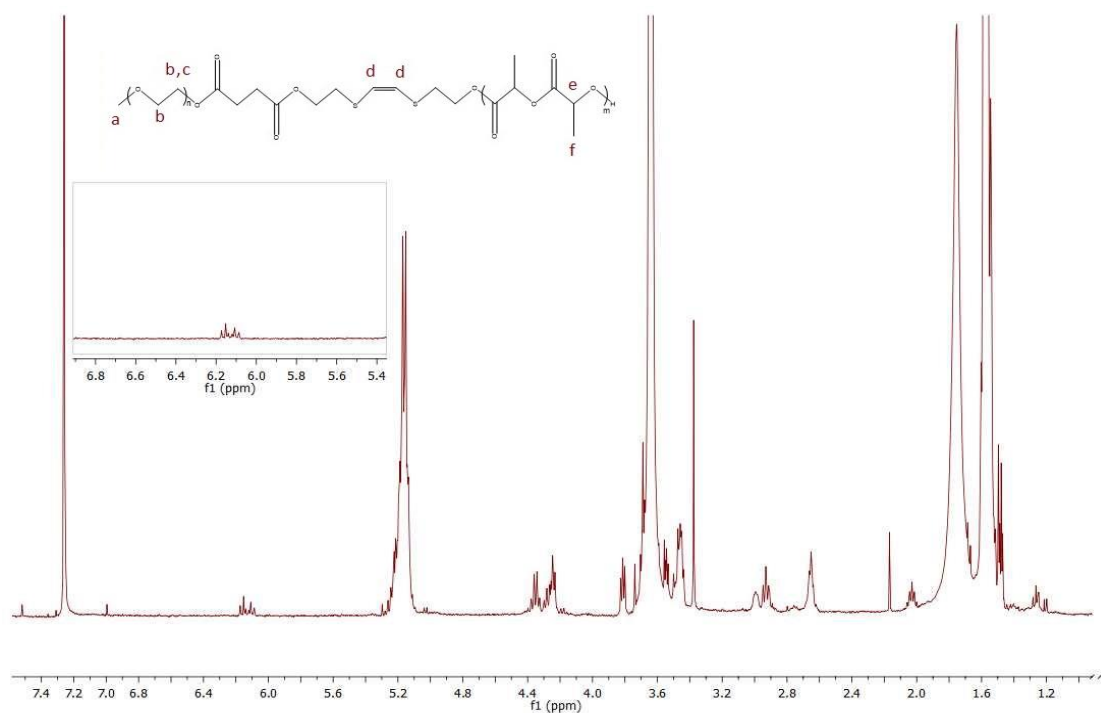


Figura C2 – Espectro  $^1\text{H}$  NMR como resultado da síntese do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub>, em  $\text{CDCl}_3$ .

---

## Anexo D: Determinação do CMC micelar

*Tabela D1 – Valores da Concentração Micelar Crítica para cada polímero.*

<b><i>Polímero</i></b>	<b>CMC (1º ensaio)</b>	<b>CMC (2º ensaio)</b>
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>1k</sub></i>	$1,40 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$	$1,94 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$
<i>PEG<sub>5k-seg</sub>-PLA<sub>1k</sub></i>	$1,23 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$	$1,00 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$
<i>PEG<sub>5k</sub>-PLA<sub>2k</sub></i>	$1,59 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$	$1,86 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$
<i>PEG<sub>5k-seg</sub>-PLA<sub>2k</sub></i>	$2,60 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$	$4,06 \times 10^{-3} \text{mg/mL}$

## Anexo E: Determinação da capacidade de encapsulação das nanopartículas

*Tabela E1 – Resultados intensidade máxima a 589,5nm, que permite calcular os valores de concentração da cuvete através da reta linear de calibração da Dox em DMSO, bem como os valores de concentração da amostra. Daqui calcula-se os valores de DLC (%) e DLE (%) para as nanopartículas do copolímero de bloco PEG<sub>5k</sub>-seg-PLA<sub>2k</sub>.*

<i>amostra</i>	<b>Intensidade max. a 589,5nm</b>	<b>Concentração da cuvete (mg/mL)</b>	<b>Concentração da amostra (mg/ml)</b>	<b>DLC (%)</b>	<b>DLE (%)</b>
<i>A JF</i>	374,725347	0,000916545	0,0183309	2,749635	2,749635
<i>B JF</i>	253,967692	0,000584455	0,011689095	1,870255	3,74051
<i>C JF</i>	516,773745	0,001307186	0,02614372	3,137246	3,137246
<i>D JF</i>	896,11625	0,002350399	0,047007981	8,461437	8,461437
<i>E JF</i>	312,1718	0,000744519	0,014890386	2,382462	4,764923
<i>F JF</i>	368,200537	0,000898601	0,017972028	2,695804	5,391609

*Concentração da cuvete = declive da reta de calibração da Dox em DMSO*

*Concentração da amostra = 2 × Concentração da cuvete/0.1*