



Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas  
Gerais - Universidade Federal de Itajubá

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA HÍBRIDAS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO  
DOXORRUBICINA COMO UM POTENCIAL SISTEMA APLICADO AO  
TRATAMENTO DO CÂNCER

Aluno: Bianca Rodrigues Silva Borges

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares

Coorientadora: Prof(a). Dra. Marli Luiza Tebaldi

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Química Medicinal

Itabira

dezembro de 2020

Bianca Rodrigues Silva Borges

NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA HÍBRIDAS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO  
DOXORRUBICINA COMO UM POTENCIAL SISTEMA APLICADO AO  
TRATAMENTO DO CÂNCER

Dissertação apresentada como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Química submetido ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais pela Universidade Federal de Itajubá.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares  
Co-orientador: Profa. Dra. Marli Luiza Tebaldi

Itabira  
dezembro de 2020

## **COLABORADORES**

Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

*Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.*

*Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Campus da UFMG.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me sustentou e esteve comigo durante cada etapa deste processo. A Ele toda honra e glória!

Aos meus pais Jorge e Maria, à minha irmã Beatriz e aos meus amigos do coração, por todo apoio, incentivo e amor que me são fundamentais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Cristian, que sempre se mostrou disponível a me ajudar em todos os momentos, e que com paciência e cuidado tanto me ensinou! Fui muito abençoada por conviver estes anos com alguém que, muito além de orientar, realmente se preocupa e deseja o seu crescimento. Também sou grata à minha co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marli Luiza Tebaldi, que também se empenhou tanto para me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, que me acompanhou de perto em cada etapa, me instruindo nos mínimos detalhes com toda atenção e dedicação.

Agradeço aos colegas do laboratório de Bioengenharia, por toda troca de conhecimento, apoio e companheirismo durante estes anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo H.M. Nunes, pela disponibilidade em sanar dúvidas e pela colaboração nos experimentos de difração de raios X.

À CAPES e a UNIFEI pelo apoio financeiro e a todos que de alguma forma contibuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

O câncer acomete diversas pessoas no mundo e é uma das enfermidades responsáveis, atualmente, pelas principais causas de morte em todo o mundo. As terapias utilizadas para eliminar as células cancerosas, infelizmente, também atuam contra células saudáveis do organismo, dada a baixa seletividade de ação. Diante dessa realidade, a busca por tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos têm sido objeto de intensas pesquisas em todo o mundo e com resultados promissores, principalmente com o emprego de sistemas carreadores nanoestruturados. Nesse trabalho, nanopartículas (NP) de sílica SBA-16 foram sintetizadas e funcionalizadas com o 3-aminopropiltriétoxissilano e testes foram realizadas em ambas as matrizes. A técnica de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) possibilitou visualizar bandas características dos materiais sintetizados como: grupos silano (Si-O-Si) e grupos silanol (Si-OH) para o SBA-16, grupo etílico, grupos silano e banda de hidroxila menos intensa nos espectros do SBA-16 funcionalizado (APTES-SBA-16). Os ensaios de difratometria de raios em ângulos baixos (SAXS) revelaram picos padrões nas amostras, indicando a estrutura mesoporosa e cúbica de corpo centrado, do grupo espacial Im $3m$ . Com o estudo de adsorção e dessorção gasosa, realizado pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH), observou-se uma elevada área superficial para o SBA-16 de 975 m<sup>2</sup>/g e uma redução significativa da área do material após a funcionalização com o APTES, indo para 472 m<sup>2</sup>/g. As micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as amostras de SBA-16 e APTES-SBA-16 revelaram uma ordenação bem definida de poros em ambas as matrizes. O teste também evidenciou a modificação do material após a funcionalização, devido a utilização de espectroscopia de perda de energia por elétrons (EELS), em que foi possível observar a presença dos átomos de nitrogênio do material funcionalizado. As análises termogravimétricas também ajudaram a comprovar a funcionalização das amostras de SBA-16 por meio de diferença de massa entre as amostras dos materiais obtidos. Os dados encontrados de tamanho médio de ambas as matrizes revelaram que os materiais produzidos tiveram tamanhos médios em torno 300 nm, tamanho considerado ideal para as aplicações biomédicas. Após as devidas análises terem sido feitas nos materiais, o fármaco antitumoral Doxorubicina foi incorporado nas matrizes SBA-16 e APTES-SBA-16. A taxa de incorporação do fármaco em ambas as matrizes foi avaliada utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com DAD (*Diode Array Detector*). Para a quantificação do fármaco construiu-se uma curva de calibração com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) igual a 0,993. Os dados obtidos revelam que houve uma taxa de incorporação de 87 % para a matriz SBA-16 e 29 % para as amostras de APTES-SBA-16. Posteriormente, a sílica funcionalizada foi graftizada com o copolímero termossensível poli[(Vinilcaprolactama)-*co*-(N-isopropilacrilamida)] (PVCL-*co*-PNIPAAm) por meio da técnica ATRP, obtendo-se um material híbrido que poderá permitir o controle na liberação do

fármaco por meio de calor. Por fim, esse material híbrido foi caracterizado físico e quimicamente. Os resultados de FTIR revelaram grupos característicos dos polímeros utilizados. As análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) apontaram que a amostra possui tamanho médio de 447,5 nm  $\pm$  34 nm e índice de polidispersividade igual a 0,223. Tais resultados indicam se tratar de um material monodisperso com tamanho ideal para ser utilizado como um biocarreador por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentado (EPR).

**Palavras-chave:** Câncer, Polímeros Termossensíveis, ATRP, Nanopartículas, SBA-16, APTES, Doxorubicina, Liberação controlada.

## ABSTRACT

Cancer affects several people in the world and it is one of the diseases responsible for the main causes of death worldwide. Unfortunately, the therapies used to eliminate cancer cells also act against healthy cells, due to their low selectivity action. Inside this reality, the searches for more effective treatments that would cause less adverse effects have been encouraged, specially treatments involving the use of nanostructured carrier systems, considering their promising results. In this work, SBA-16 silica nanoparticles were synthesized and functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane and tests were performed on both matrices. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique made it possible to visualize characteristic bands of the synthesized materials such as: silane groups (Si-O-Si) and silanol groups (Si-OH) for SBA-16, ethyl group, silane groups and less intense hydroxyl band in the functionalized SBA-16 spectrum (APTES-SBA-16). The small angle X-ray scattering (SAXS) test revealed standard peaks from the samples, indicating the mesoporous and body cubic centered structure, of the Im3m spatial group. The study of adsorption and gas desorption, using Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method, showed a high surface area for SBA-16 (975 m<sup>2</sup>/g) and a significant reduction in the area of the functionalized material (472 m<sup>2</sup>/g). The micrographs obtained by transmission electron microscopy (TEM) technique for SBA-16 and APTES-SBA-16 samples revealed a well-defined pore ordering in both matrices. The test also showed the modification of the material after functionalization, due to the use of electron energy loss spectroscopy (EELS), in which it was possible to observe the presence of nitrogen atoms in the functionalized material. Thermogravimetric analysis also helped to prove the functionalization of SBA-16 samples by the difference of mass between the samples obtained. The data showed average sizes (300 nm) on both matrices, size considered ideal for biomedical applications. After specified analysis had been made in the materials, the antitumor drug Doxorubicin was incorporated in the matrices SBA-16 and APTES-SBA-16. The rate of drug incorporation in both matrices was evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC)

technique with a DAD (Diode Array Detector). To quantify the drug, a calibration curve was constructed with a coefficient of determination ( $r^2$ ) equal to 0.993. The data obtained reveal there was an incorporation rate of 87 % for SBA-16 matrix and 29 % for APTES-SBA-16 samples. Subsequently, the functionalized silica was grafted with the thermosensitive copolymer [poly(Vinylcaprolactam) -*co*-(N-isopropylacrylamide)] (PVCL-*co*-PNIPAAm), obtaining a hybrid material that may control the drug release by means of heat. Finally, this hybrid material was characterized physically and chemically. The FTIR results revealed characteristic groups of polymers used. The dynamic light scattering (DLS) analysis showed that the sample has an average size of 447.5 nm  $\pm$  34 nm and a polydispersity index equal to 0.223. Such results indicate that it is a monodisperse material with an ideal size to be used as a biocarrier, due to the enhanced permeation and retention (EPR).

**Key words:** Cancer, Thermosensitive Polymers, ATRP, Nanoparticles, SBA-16, APTES, Doxorubicin, Controlled release.

## LISTA DE ABREVEATURAS

ANOVA: Análise de variância

APTES: 3-aminopropiltriétoxissilano

ATR: Reflexão total atenuada

ATRP: Atom Transfer Radical Polymerization

BET: Adsorção-dessorção de nitrogênio (Brunauer, Emmett, Teller)

BJH: Barrett-Joyner-Halenda

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CuBr: Brometo de Cobre

DAD: Diode Array Detector

DLS: Espalhamento Dinâmico da Luz

DOXO: Doxorrubicina

SBA-16-APTES-DOX: Sílica SBA-16 funcionalizada com APTES com DOXO incorporada

SBA-16-APTES-DOX-Br: Macroiniciador Bromado

SBA-16-APTES-DOX@PVCL-*co*-PNIPAAm: Material híbrido

DSC: Calorimetria exploratória diferencial (Differential Scanning Calorimetry)

EELS: Espectroscopia de perda de energia por elétrons

EPR: Efeito de Permeabilidade e Retenção (Enhanced Permeation and Retention)

FDA: Food and Drug Administration

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HCl: Ácido Clorídrico

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LCST: Lower Critical Solution Temperature (Temperatura crítica inferior de solubilidade)

Ln: Ligante

M: Monômero

MCM-41: Mobil Crystalline Materials

MET: Microscopia Eletrônica de transmissão

MSNs - Mesoporous silica nanoparticles

PDI: Índice de polidispersão

PEG: Polietilenoglicol



PMDETA: Pentametildietileno-triamina

Pn: Polímero

PNIPAAm: Poli(N-isopropilacrilamida)

PRC: Polimerizações via radical livre convencional

PRV: Polimerizações via radical livre controlada/viva

PVCL: Poli(Vinilcaprolactama)

RAFT: Polimerização via transferência reversível por adição-fragmentação

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SAXS: Small Angle X-Ray Scattering

SBA: Santa Barbara Amorphous

TEOS: Tetraetilortosilicato

TGA: Análises termogravimétricas

[TM]: Metal de transição;

UCST: Upper Critical Solution Temperature (Temperatura crítica superior de solubilidade)

X: Haleta (Br ou Cl)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cúbica de corpo centrado do SBA-16-----	18
Figura 2: Funcionalização do SBA 16 com o agente modificador APTES-----	18
Figura 3: Fórmula estrutural plana da doxorrubicina-----	20
Figura 4: Hidrólise do grupo alcóxido com formação dos grupos reativos do tipo silanois-----	23
Figura 5: Condensação dos grupos silanois que resulta na formação da rede de ligações siloxano----	23
Figura 6: Reação de funcionalização do SBA – 16 com APTES-----	24
Figura 7: Espectros FTIR das amostras de APTES-SBA-16 e SBA-16-----	29
Figura 8: Estudos de difração SAXS feitos em amostras de SBA-16 (preto) e APTES-SBA-16 (azul)- -----	30
Figura 9: Termogramas de amostras de nanopartículas de sílica funcionalizadas (APTES-SBA-16) e não funcionalizadas (SBA -16), obtidos na faixa de temperatura de 25 a 600 °C-----	31
Figura 10: Análise de adsorção física e química (método BET) para as amostras de SBA-16 (A) e APTES-SBA-16 (B)-----	34
Figura 11: Distribuição do tamanho, tamanho médio, índice de polidispersividade das nanopartículas (A) SBA-16 e (B) APTES-SBA-16-----	36
Figura 12: Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das amostras (A) SBA-16, (B) APTES-SBA-16. Em (C) está representada a espectroscopia de perda de energia eletrônica (EELS) evidenciando os átomos de nitrogênio na cor vermelha. Em (D) está disponível a análise do perfil da ordenação da matriz [linha branca na imagem (A)] feita pelo software Image J®-----	38
Figura 13: Curva de calibração de Doxorrubicina na faixa de 5 a 200 µg/mL obtida por meio da técnica de CLAE-DAD-----	40
Figura 14: Cromatograma que representa o tempo de retenção fármaco Doxorrubicina-----	41
Figura 15: Resultado dos estudos da taxa de incorporação de DOXO em diferentes concentrações (100 e 200 µg/mL) em matrizes SBA-16 também em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/mL). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ao nível de P<0.05. A sigla n.s. significa que não há diferença estatística entre os grupos comparados por meio de análise de variância (ANOVA)-----	42
Figura 16: Estudo da taxa de incorporação de DOXO em diferentes concentrações (100 e 200 µg/mL) em matrizes APTES-SBA-16 também em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/mL). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ao nível de P<0.05 (ANOVA)-----	43

Figura 17: Estudo da taxa de incorporação de DOXO em diferentes concentrações (100 e 200 µg/mL) tanto das matrizes SBA-16 como nas matrizes APTES-SBA-16, também em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/mL). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ao nível de P<0.05 (ANOVA)-----	44
Figura 18: Esquema do comportamento esperado de um polímero termossensível submetido à diferentes condições de temperatura-----	48
Figura 19: Representação simples de uma reação de polimerização radicalar convencional-----	48
Figura 20: Processo de terminação por desproporcionamento-----	49
Figura 21: Descrição do mecanismo geral da polimerização via técnica ATRP-----	51
Figura 22: Ilustração esquemática da reação de obtenção do macroiniciador SBA-16-APTES-DOX-Br-----	52
Figura 23: Ilustração esquemática da síntese de nanopartículas híbridas de sílica revestidas de poli [(Vinilcaprolactama) - <i>co</i> - (N-isopropilacrilamida)], SBA-16-APTES-DOX@PVCL- <i>co</i> -PNIPAAm, via técnica ATRP-----	53
Figura 24: Em (A) (B) e (C) amostras do material híbrido obtido via ATRP, pelas sínteses 1, 2 e 3 respectivamente ( <b>Tabela 3</b> ) após lavagem com etanol-----	55
Figura 25: Amostras do material híbrido obtido via ATRP pela rota de síntese 4 ( <b>Tabela 3</b> ) após lavagem com etanol(A) e metanol (B)-----	55
Figura 26: Análise de DLS de amostras constituída por SBA-16-APTES-DOXO@PVCL- <i>co</i> -PNIPAAm. (A) Distribuição do tamanho médio das partículas-----	56
Figura 27: Espectros FTIR das amostras do macroiniciador bromado e do copolímero graftizado ao material mesoporoso contendo fármaco incorporado (híbrido)-----	58

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Perda de massa referente ao SBA-16 em ciclos térmicos diferentes-----	31
Tabela 2: Perda de massa referente ao APTES-SBA-16 em ciclos térmicos diferentes-----	32
Tabela 3: Valores dos parâmetros utilizados nas sínteses via ATRP-----	53

## INTRODUÇÃO

O câncer é o conjunto de mais de 100 doenças e pode ser caracterizado pelo crescimento desordenado de células, que se dividem muito rapidamente e têm a tendência de serem muito agressivas e incontroláveis, formando tumores que podem se espalhar para outras partes do corpo por um processo denominado metástase (INCA, 2018). O câncer tem acometido pessoas de diversas idades e é atualmente a enfermidade responsável pelas principais causas de mortalidade no mundo (BRAY *et al.*, 2018). Nos últimos dados do INCA (2020 – incidência de câncer no Brasil), foram estimatimados para o triênio 2020-2022, em torno de 600 mil novos casos da doença. Essa estimativa reflete o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon do reto dentre os principais casos (INCA, 2020). Os tratamentos mais comuns são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia ou transplante de medula óssea, sendo muitas vezes necessária a combinação de mais de um método (INCA, 2018). A quimioterapia é um tratamento no qual se utilizam fármacos para combater o câncer e, infelizmente, esse tipo de tratamento contabiliza severos efeitos adversos principalmente devido ao fato de terem baixa seletividade por células tumorais (LAVAN *et al.*, 2003; LANGER, 1990; BANGHAM *et al.*, 1965). A baixa seletividade desses agentes afeta significativamente alguns tecidos, como a medula óssea. Com isso, alguns dos efeitos colaterais são: cansaço aos pequenos esforços, falta de ar, palidez, febre, pintas avermelhadas na pele, manchas roxas e vermelhas e sangramentos (INCA, 2018). Diante dessa realidade, a busca por novos tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, tem sido objeto de intensas pesquisas em todo o mundo, principalmente com o emprego de sistemas carreadores nanoestruturados.

Recentemente, a nanotecnologia surgiu como uma abordagem que tem motivado os pesquisadores a desenvolver materiais nanoestruturados (ZHOU *et al.*, 2018). Nanocarreadores são nanoestruturas associadas por uma ou mais substâncias ativas contra as células tumorais. Os nanocarreadores devem ser capazes de direcionar o fármaco a um alvo específico do organismo, no qual deve agir, executando uma liberação controlada. São diversas as vantagens existentes ao se utilizar esse tipo de sistema, dentre elas estão: (i) Redução da dosagem; (ii) Seletividade em relação ao alvo biológico (tecido ou células); (iii) Redução dos efeitos colaterais e (iv) Liberação controlada evitando picos de dosagem, características típicas de fármacos convencionais. Essa especificidade da ação é uma premissa importante para o tratamento de várias doenças, entre as quais se destaca o câncer, uma vez que há a possibilidade de redução da dosagem, o que por sua vez minimiza os efeitos adversos (CAIXETA, 2013).

Dentre vários sistemas nanoestruturados existentes, destacam-se os baseados em polímeros, metais e óxidos metálicos, semicondutores e materiais cerâmicos, como por exemplo, as nanopartículas de sílica (WICKI *et al.*, 2015). As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs - do inglês: *mesoporous*

*silica nanoparticles*) apresentam relevantes propriedades físicas e químicas, e ainda expressiva biocompatibilidade. Atualmente observa-se um crescente aumento no interesse de muitas linhas de pesquisas na utilização das MSNs como sistemas carreadores de fármacos, por apresentarem elevada área superficial e a capacidade de incorporar significativas quantidade de moléculas de interesse terapêutico ou diagnóstico (WEISS *et al.*, 2016).

Apesar de importantes resultados obtidos no emprego das MSNs nas pesquisas aplicadas no tratamento de tumores, o sistema ainda apresenta alguns inconvenientes que estão relacionados principalmente, quanto a dificuldade de se controlar a liberação do agente antitumoral, que ocorre basicamente por difusão e exclusivamente no tecido alvo (COUTINHO, 2014). Neste ínterim, buscando contornar estes problemas, no presente trabalho um sistema nanoestruturado híbrido contendo um núcleo de sílica revestido por uma coroa de polímeros termorresponsivos foi desenvolvido. Essa classe de polímeros possui um ponto crítico de temperatura, que quando atingido, faz com que os mesmos experimentem uma transição de fase. Como a temperatura na região tumoral é diferente da observada no restante do organismo, é possível fazer com que a mudança estrutural de tais polímeros ocorra especificamente nessa região, liberando ali um fármaco incorporado. Dessa forma, o material híbrido proposto pode melhorar de forma significativa a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade sistêmica.

## **OBJETIVO**

O trabalho tem como principal objetivo a preparação de um sistema híbrido baseado em nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-16, contendo o fármaco doxorrubicina e recobertas com o copolímero PVCL-*co*-PNIPAAm, como um potencial sistema terapêutico contra o câncer. Constituem os objetivos específicos:

- Sintetizar e silanizar nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-16 com o 3-aminopropil-trietoxi-silano (APTES);
- Estudar a taxa de incorporação do fármaco doxorrubicina na matriz silanizada;
- Desenvolver metodologia de CLAE-DAD para análise quantitativa de doxorrubicina incorporada nas matrizes;
- Caracterizar físico-quimicamente e morfologicamente as matrizes dos materiais obtidos
- Desenvolver rota de síntese via técnica ATRP para a obtenção de material híbrido constituído de nanopartículas de sílica e o copolímero PVCL-*co*-PNIPAAm;
- Caracterizar de forma física, química os materiais obtidos em cada uma das etapas envolvidas no processo de preparação do material híbrido;



## CAPÍTULO 1

### SÍNTESE DO MATERIAL NANOESTRUTURADO E ESTUDO DA TAXA DE INCORPORAÇÃO DE DOXORRUBICINA

#### **1. Considerações gerais**

Nos últimos anos, houve um rápido crescimento na área de biomedicina, particularmente na exploração de novos sistemas de entrega seletiva de fármacos no tratamento do câncer. A nanotecnologia surgiu como uma abordagem promissora com o desenvolvimento de materiais nanoestruturados (ZHOU *et al.*, 2018). Entre os diferentes nanocarreadores desenvolvidos, as MSNs têm atraído a atenção da comunidade científica por possuírem diversas vantagens na administração de quimioterápicos em relação a outros nanocarreadores. Algumas dessas vantagens, são: fabricação simples e econômica, estrutura não tóxica de grande volume de poros e grande área superficial que permite excelente capacidade de incorporação de moléculas bioativas e comportamento endocitótico desejável (MOREIRA *et al.*, 2016). A superfície das MSNs pode ser facilmente alterada por meio de funcionalizações, o que possibilita a aquisição de novas propriedades que podem aumentar a eficiência em aplicações biomédicas. Além disso, a funcionalização também pode influenciar de modo significativo à incorporação de fármacos, os perfis de liberação farmacocinética e sua interação com células, tecidos ou moléculas, tornando as MSNs muito atraentes para diversas aplicações em nanomedicina e biotecnologia (FREITAS, 2015).

O presente capítulo descreve as principais etapas adotadas durante a síntese de nanopartículas de sílica SBA-16 funcionalizadas com 3-aminopropil-trietoxissilano (APTES) e a caracterização físico-química e morfológica dos materiais obtidos. Também está apresentado o estudo da taxa de incorporação do fármaco doxorubicina nas matrizes obtidas.

#### **1.2. Fundamentação teórica**

##### **1.2.1. Nanopartículas de sílica aplicadas no tratamento do câncer**

A sílica é um polímero inorgânico que apresenta em sua composição grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior e tem grande concentração de grupos silanóis, Si-OH, cobrindo toda a sua superfície. Esse material se organiza em lamelas (camadas) ou tubos, e possui poros já na sua composição cristalina natural (FELIX *et al.*, 2012). É uma substância endógena, podendo ser encontrada em ossos e cartilagens e também é frequentemente usada em formulações de medicamentos (ROSENHOLM *et al.*, 2012). Dentre vários materiais nanoestruturados integrados, nanopartículas de sílica mesoporosa se mostram bastante promissoras para aplicação biomédica. Essas MSNs possuem diversas propriedades interessantes, tais como: (i) Estrutura porosa ordenada. (ii) Grande volume de poros e



área superficial específica, mostrando alto potencial para carregamento de moléculas. (iii) Tamanhos de partícula ajustáveis, de 50 a 300 nm, os quais são adequados para fácil endocitose por células vivas. (iv) Duas superfícies funcionais (poro cilíndrica e superfície de partícula exterior), contendo silanol e podendo ser seletivamente funcionalizadas para melhor controle sobre a incorporação e liberação de fármacos e (v) Boa biocompatibilidade.

Recentemente, a sílica foi reconhecida como substância segura pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA). Estas características únicas fazem das MSNs materiais promissores para utilização em sistemas controlados de carreamento de fármacos (ZHOU *et al.*, 2018).

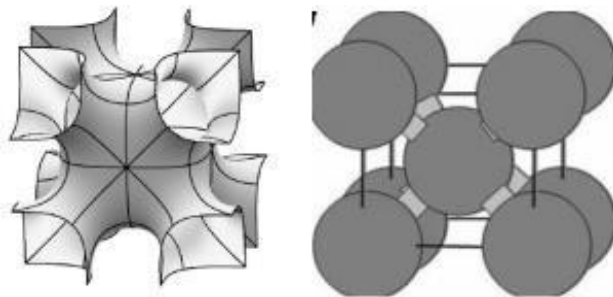
Para fins anticancerígenos, as MSNs têm sido usadas em um grande número de estudos. Tais estudos avaliam o seu uso como sistemas de diagnóstico (imagem de fluorescência ou ressonância magnética), dispositivos terapêuticos (administração de fármacos ou terapia fototérmica) ou mesmo como agentes teranósticos (nanotransportadores únicos capazes de combinar as funções diagnósticas e terapêuticas). Com esse grande número de possíveis aplicações no tratamento do câncer, esforços têm sido feitos para otimizar o tamanho dessas nanopartículas, bem como melhorar sua arquitetura e propriedades de superfície para conseguir aumentar sua biocompatibilidade, biodistribuição e acúmulo em sítios tumorais (MOREIRA, 2016).

As estruturas mesoporosas que melhor representam essa classe de materiais são os MCM-41 (Mobil Crystalline Materials), com um arranjo hexagonal dos mesoporos e poros com formato cilíndrico, os MCM-48, com um arranjo cúbico e os MCM-50 que possuem uma estrutura laminar (COUTINHO, 2014). Entre esses materiais mesoporosos, a sílica SBA-16 se destaca como uma mesoestrutura cúbica de corpo centrado com diâmetros de poros grandes e uma estreita distribuição de poros (**Figura 1**). Os mesoporos estão num arranjo cúbico tridimensional com grupo espacial  $Im\bar{3}m$ , sendo os poros da ordem de 5-15 nm, com elevada área superficial (400-1000 m<sup>2</sup>/g) e alta estabilidade térmica (ANDRADE, 2011; OLIVEIRA, 2013). No arranjo cúbico de corpo centrado do SBA-16, cada poro está conectado com seus oito vizinhos mais próximos formando um sistema de rede mesoporosa multidirecional, o que facilita a difusão de várias espécies (OLIVEIRA, 2013).

Outra característica interessante do SBA-16 é a possibilidade de modificações em sua superfície, na qual existem diversos grupamentos hidroxilas fáceis de funcionalização. Esse processo de funcionalização permite a preservação da mesoestrutura do material e proporciona propriedades de superfície vantajosas. Na utilização da sílica como sistema de liberação controlada de moléculas bioativas, essas modificações são necessárias e cruciais, pois podem garantir uma maior seletividade de um adsorvente específico e controlar melhor sua liberação. Esse comportamento pode ser explicado porque na sílica pura as interações entre os grupos silanois e o fármaco ocorrem de forma muito intensa, conseqüentemente, a liberação do ativo pode não ocorrer de forma adequada (Ma *et al.*, 2017;

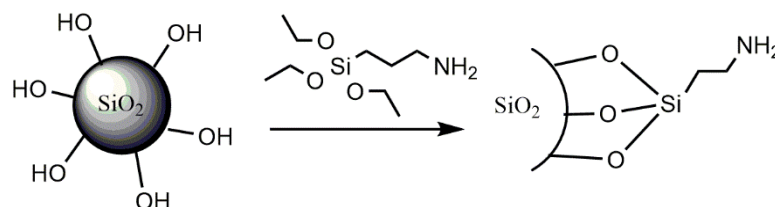
ANDRADE, 2012).

Figura 1: Estrutura cúbica de corpo centrado do SBA-16. Adaptado de: GOBIN, 2006.



Um dos processos de funcionalização bastante explorado por trabalhos previamente publicados na literatura, consiste em realizar o acoplamento de um agente modificador à superfície da sílica, sendo este agente o responsável por proporcionar uma nova funcionalidade à nanopartícula (COUTINHO, 2014). Entre os agentes de acoplamento de silano, o 3-aminopropil-trietoxissilano (APTES) é um dos agentes mais amplamente utilizados. A sua estrutura inclui um grupo funcional amina (-NH<sub>2</sub>) e três grupos hidrolisáveis que podem ser fixados à superfície da sílica. Na pós-funcionalização, grupos amina do APTES permanecem disponíveis nas extremidades para futuros acoplamentos, enquanto os grupos hidrolisáveis são ligados aos grupos hidroxila na superfície das partículas de sílica. Na **Figura 2**, está apresentado um esquema simplificado do processo de silanização de nanopartículas de sílica com o agente modificador APTES (BERKTAS *et al.*, 2020).

Figura 2: Funcionalização do SBA 16 com o agente modificador APTES.



O processo de silanização se dá por meio de reações de condensação entre o alcoxissilano e os grupos silanóis da superfície da sílica, tipicamente realizado em solução, usando solventes orgânicos anidros, como, por exemplo, tolueno. O grau de silanização interfere no valor da carga superficial das MSNs, nas ligações químicas com moléculas funcionais dentro ou fora dos poros e no controle do

tamanho do poro, devido à entrada de novas moléculas no interior desses nanoporos. Ao grau de silanização também estão associados os fatores: diminuição da hidrofobicidade, aumento da estabilidade hidrotérmica e maior capacidade de adsorção das MSNs. Sendo a análise elementar uma das formas de se calcular o grau de silanização das matrizes mesoporosas, que está associado à quantidade de grupos funcionais inseridos na rede inorgânica (BRITO, VALE, 2015; KWON *et al.*, 2013; ZHAO, 2019).

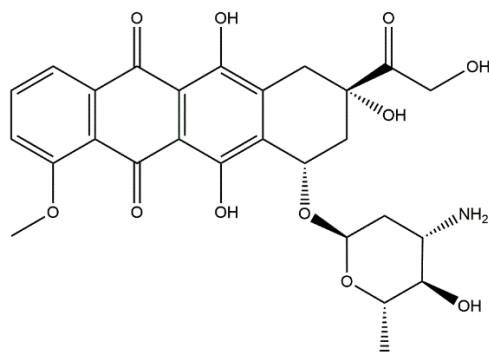
### 1.2.2. Doxorubicina

A doxorubicina (DOXO) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius*. O fármaco (**Figura 3**) possui um amino açúcar ligado a um anel tetracíclico e componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, o que torna essa molécula adequada em reações de transferência de elétrons (CANDIDO, 2013). É um fármaco considerado um dos agentes antitumorais mais utilizados e potentes para o tratamento de cânceres, em diferentes fases de seu desenvolvimento, tais como: leucemia, pulmão, mama, sarcoma de estômago e ovário (YILDIZ, 2018).

São três os principais mecanismos de ação citotóxica da DOXO. O primeiro deles consiste na capacidade que as antraciclinas tem de se intercalarem com as bases do DNA, o que acaba por danificar os processos de transcrição e replicação. O segundo mecanismo, o mais importante, se processa por meio da formação de um complexo tripartido com a topoisomerase II. O complexo formado inibe a religação dos filamentos do DNA, induzindo a célula aos processos de apoptose. Os grupamentos quinonas presentes na DOXO geram radicais livres tanto em solução quanto em tecidos. Essa característica é responsável por causar cardiotoxicidade acentuada, sendo este o terceiro mecanismo causador de apoptose das células que entram em contato com o fármaco.

Contudo, embora o fármaco possua relevante atividade antineoplásica, a sua toxicidade tem limitado sua aplicação terapêutica. Os principais efeitos colaterais causados pela DOXO são: estomatite, náuseas e vômitos, alopecia e manifestações dermatológicas, além da depressão temporária da medula óssea. No entanto, os principais efeitos são os danos cardíacos como taquicardia, arritmias, hipotensão, derrame pericárdio e insuficiência cardíaca congestiva (YILDIZ, 2018). Porém, a encapsulação do fármaco em carreadores nanoestruturados pode reduzir estes efeitos e melhorar sua eficácia, oferecendo vários benefícios, como o aumento da expectativa de vida dos doentes, diminuição do tumor e da sua progressão (CAIXETA, 2013).

Figura 3: Fórmula estrutural plana da doxorubicina.



O Doxil (doxorubicina lipossomal peguilada), foi o primeiro anticâncer encapsulado em lipossomas, um sistema nanostruturado lipídico, aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de câncer de ovário. Alguns estudos demonstraram que o Doxil foi capaz de reduzir problemas de cardiotoxicidade e teve uma eficácia antitumoral semelhante em comparação ao fármaco convencional (XING *et al.*, 2015). No entanto, ainda existem dúvidas quanto aos benefícios da peguilação no tratamento do câncer. O polietilenoglicol, PEG, é uma macromolécula a qual sua presença na superfície lipossomal pode diminuir as interações dos lipossomas com as células e impedir a entrada de lipossomas no tecido tumoral. Estudos mostram que o uso de Doxil no tratamento de carcinomas apresentou poucas vantagens, pois o tempo de circulação é aumentado, mas há pouca maximização do acúmulo do fármaco no tumor. Além disso, o Doxil tem sua dose limitada, pois provoca a síndrome da mão-pé, caracterizada por erupções cutâneas nas palmas das mãos e/ou solas dos pés, levando à interrupção da terapia por pelo menos 2 semanas e diminuição em dosagem subsequente em 25 % (Folheto Informativo do Produto Doxil) (RIVANKAR, SANGEETA, 2014). Sendo assim, o progresso no uso de sistemas nanocarreadores no tratamento do câncer é evidente, no entanto, é importante ressaltar a importância da continuidade de pesquisas que possam promover melhoria quanto à eficácia e maior segurança da implementação desses sistemas (PATRA *et al.*, 2018). Além disso, sistema conjugado com o PEG tem apresentado diversos efeitos colaterais, tais como: hipersensibilidade e respostas imunológicas, acúmulo nos tecidos, e depuração sanguínea acelerada após exposição repetida (PELEGRI-O'DAY, 2014).

Uma estratégia nesse sentido é a busca de novas alternativas além do PEG, ou seja, a utilização de polímeros mais biodegradáveis e biocompatíveis. Embora o PEG permaneça o único conjugado de polímero aprovado pelo FDA, muitos outros polímeros são amplamente reconhecidos como biocompatíveis para seu uso em aplicações biomédicas e vários estudos têm mostrado excelentes propriedades *in vitro* e *in vivo* com polímeros alternativos (PELEGRI-O'DAY, 2014).

### 1.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é uma técnica bastante usada na indústria farmacêutica, bem como em aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina. A técnica possui adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, que pode separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI *et al.*, 2002). Esse método é constituído de uma coluna que contém uma fase estacionária, uma bomba que move a fase móvel através da coluna e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas. O tempo de retenção consiste no tempo em que o analito específico elui (sai do final da coluna), e varia dependendo das interações entre a fase estacionária e os solventes utilizados. A amostra a ser analisada é introduzida em pequeno volume no fluxo de dispositivos de fases móveis e é retardado por interações químicas ou físicas específicas com a fase estacionária. Os solventes mais comuns utilizados incluem quaisquer combinações miscíveis de água ou líquidos orgânicos (os mais comuns são o metanol e acetonitrila) (MALVIYA *et al.*, 2010).

A técnica CLAE permite analisar misturas de compostos promovendo sua separação de acordo com as características físicoquímicas de cada composto e com a interação destes com a fase estacionária e a fase móvel. Na fase estacionária, uma grande variedade de adsorventes pode ser utilizada, desde fases de sílica modificadas de C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> (fases reversas), resinas poliméricas, alumina, carvão, sílica, ciano e outras. As interações entre as fases podem ocorrer por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de Van der Waals. Dependendo da natureza da interação, o modo de separação é classificado em cromatografia em fase reversa ou fase normal. Nos casos das fases reversas, a retenção do analito acontece devido, primeiramente, às interações de van der Waals não polares, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Já no modo normal, as principais interações são entre grupos polares do analito e da fase extratora através de ligações de hidrogênio, interações  $\pi - \pi$  e dipolo-dipolo. A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada e emprega fase estacionária de baixa polaridade e fase móvel de maior polaridade, a fase normal utiliza polaridades invertidas. Duas fases reversas são bastante utilizadas na análise CLAE, a fase estacionária de octadecil (C<sub>18</sub>) que é altamente apolar, e a fase estacionária constituída de Octil (C<sub>8</sub>) que é moderadamente apolar (SILVA, 2012; HESS, 2011).

Uma etapa importante da CLAE é o sistema de detecção, no qual os componentes separados pela coluna serão caracterizados e quantificados. Para escolher o método mais adequado para uma determinada análise, deve-se considerar o tipo de analito a ser avaliado e o nível de sensibilidade requerido pela análise. Existem diversos tipos de sistemas de detecção e entre eles destacam-se: o

detector por emissão de fluorescência (FL), espectrometria de massas (EM), medida da absorção de luz ultravioleta por espectrofotômetro (UV) e arranjo de diodos (DAD) (VILAS BOAS, 2016). A detecção por UV/VIS, apresenta limitação quanto a detecção de algumas substâncias, o que pode ser atribuída à presença de cromóforos (comumente encontrados em produtos naturais), na faixa de aplicação selecionada para esse detector. Tal limitação foi facilitada pelo desenvolvimento do detector de arranjo de diodo (DAD), que permite avaliar múltiplos comprimentos de onda simultaneamente, realizando uma varredura que se estende de 200-800 nm (QUEIROZ, 2009).

O DAD consiste em uma série de detectores fotodiodos posicionados lado a lado em um cristal de silício. Assim, toda a luz que emerge da amostra é dispersa em uma grade holográfica, sendo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto desse arranjo, e consequentemente o detector. Esse detector é um dos mais utilizados para o desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade. Mas vale ressaltar que eles apresentam sensibilidade diferentes para diferentes comprimentos de onda, devido às características inerentes de cada composto de interesse (ICHINOSE, 2017). Para a quantificação do fármaco Doxorrubicina, existem vários métodos analíticos descritos na literatura, incluindo métodos analíticos por UV, espectrometria de massa, eletroquímica e luminescência, sendo os métodos por fluorescência (FL) os mais explorados e existindo escassos métodos desenvolvidos envolvendo a detecção do fármaco com detector DAD (DAEIHAMED *et al.*, 2014).

### **1.3. Parte experimental**

#### **1.3.1. Síntese e funcionalização de nanopartículas de sílica SBA-16**

As nanopartículas de sílica foram sintetizadas pelo método sol-gel sob condições ácidas por meio de estudos prévios realizados por Soares *et al.*, 2013. Esse método ocorre basicamente em duas etapas: hidrólise e condensação. Na hidrólise catalisada por ácido, ocorre a rápida protonação do grupo alcóxido ligado ao silício. Dessa forma os elétrons se encontram mais afastados do átomo de silício, tornando-o mais eletrofílico e suscetível ao ataque nucleofílico da água. A partir da estrutura em que o silício está pentacoordenado, o álcool é o melhor grupo de saída e é então eliminado, resultando na inversão do tetraedro e obtendo-se os grupos reativos do tipo silanois (**Figura 4**). Durante a condensação, as moléculas hidrolisadas do agente precursor sofrem ataques eletrofílicos por íons H<sup>+</sup>, na etapa rápida, e na etapa lenta uma das moléculas que sofreu ataque eletrofílico reage com uma das moléculas que passou por hidrólise, formando ligações do tipo siloxano (Si-O-Si) (**Figura 5**).

Figura 4: Hidrólise do grupo alcóxido com formação dos grupos reativos do tipo silanois.

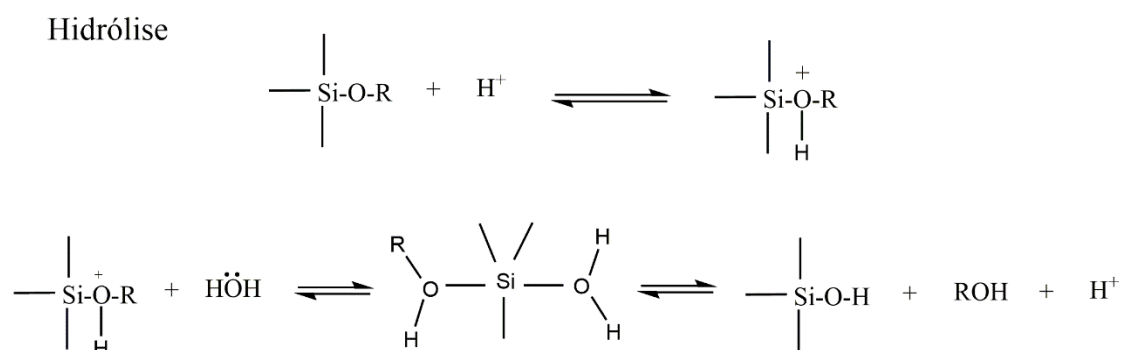
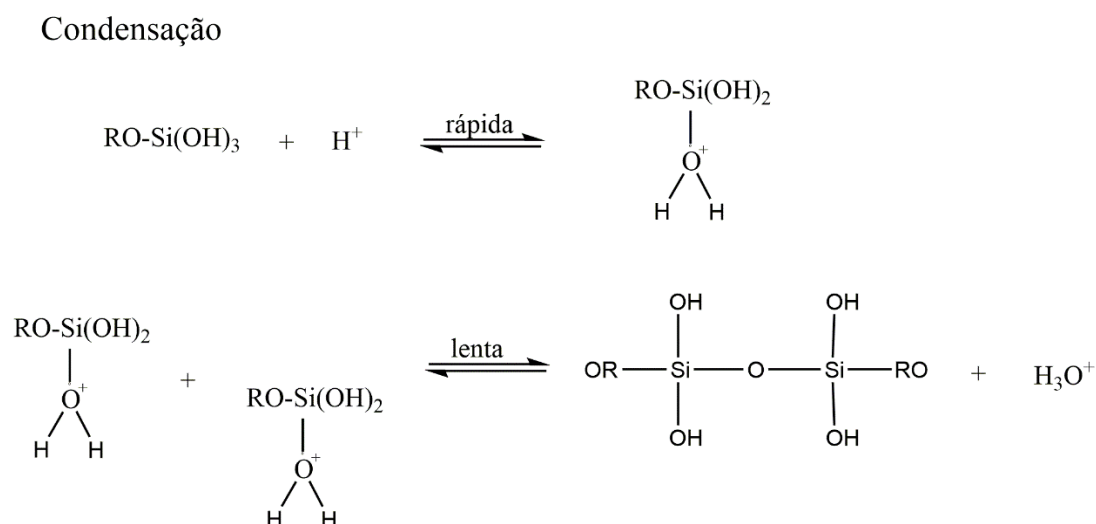


Figura 5: Condensação dos grupos silanois que resulta na formação da rede de ligações siloxano.

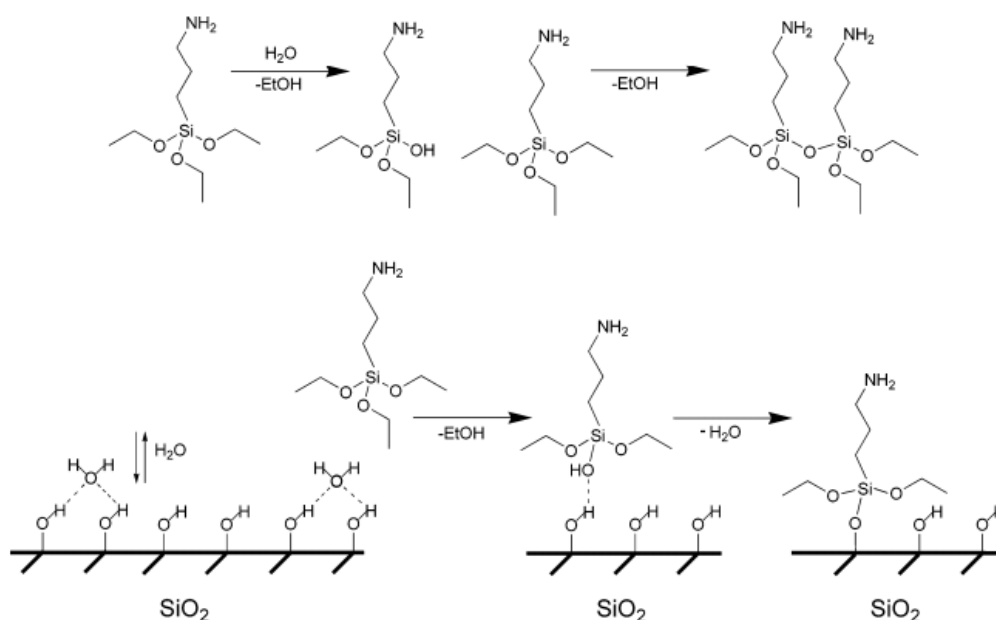


Como agente precursor e surfactante, foram utilizados TEOS (tetraetilortosilicato) (Sigma Aldrich, São Paulo-Brasil, 98 %) e Pluronic F127 (Sigma Aldrich, São Paulo-Brasil), respectivamente. Inicialmente, 3 g de Pluronic F127 foram dissolvidos em 144 mL de água. Em seguida, foram adicionados à mistura, 13.9 mL de HCl (Alphatec, São Paulo-Brasil, 38 %). O sistema permaneceu por 30 minutos sob agitação constante e em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 11 mL de butanol como cosurfactante, mantendo a proporção de 1:3 (F127:Butanol) (Butanol – Merck, São Paulo-Brasil, 99,5%). Após 1 hora, 15.3 mL de TEOS foram lentamente gotejados e o sistema foi mantido sob constante agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Na sequência, a mistura foi filtrada e o material obtido foi coletado e armazenado em estufa por 5 horas a 100 °C para

envelhecimento. O último passo consistiu no tratamento térmico do material que foi realizado em estufa usando a taxa de 5 °C/min, aquecendo-se a amostra da temperatura ambiente até 550 °C, sob atmosfera de nitrogênio.

As nanopartículas de sílica SBA-16 foram funcionalizadas (**Figura 6**) por um processo que consiste na reação entre a sílica mesoporosa SBA-16 e o oxissilano presente no APTES (3-aminopropil-trietoxissilano) (Sigma Aldrich, São Paulo-Brasil, 97 %).

Figura 6: Reação de funcionalização do SBA – 16 com APTES. Adaptado de: HOWARTER, J. A.; YOUNGBLOOD, J. P., 2006.



Nesse procedimento, 0,2 g de nanopartículas SBA-16 sintetizadas foram dispersas em solução constituída por 30 mL de tolueno (Alphatec, São Paulo - Brasil, 99,5 %) e 1 mL de APTES. O sistema foi deixado sob refluxo por 24 h a 100 °C. Posteriormente, o material obtido foi lavado com acetona (CRQ produtos Químicos - São Paulo - Brasil, grau P.A.) e filtrado. Os sólidos resultantes foram armazenados em câmara de aquecimento por 4 h sob 60 °C.

### 1.3.2. Caracterização físico-química e morfológica

#### 1.3.2.1. Caracterização química

A espectroscopia na região do infravermelho possui o objetivo de caracterizar qualitativamente as bandas características dos compostos sintetizados. Os espectros foram obtidos utilizando o equipamento Frontier da PerkinElmer, na faixa de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e 64



varreduras/min. em modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR). Uma suspensão ou solução das amostras estudadas foram espalhadas sobre a superfície do cristal de ATR.

A técnica de difração de raios-X em dispersão de baixo ângulo (SAXS) foi utilizada para identificar as fases cristalinas das amostras de SBA16 e APTES-SBA-16, além de se obter dados característicos das estruturas. Os padrões foram obtidos usando radiação síncrotron em que o raio-X incidente foi fixado em um comprimento de onda de 1,488 Å, enquanto o ângulo de espalhamento  $2\theta$  variou de 0° a 5°. As medidas de radiação síncrotron foram realizadas na linha de luz D11A-SAXS do LNLS (Campinas, Brasil).

### 1.3.2.2. Caracterizações físicas

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas no equipamento TGA 50 WS da Shimadzu (Tóquio, Japão). As amostras, em torno de 5 mg, foram analisadas nas seguintes condições: taxa de aquecimento 10 °C/min, faixa de temperatura de 35 a 750 °C e sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 20 mL/min e célula de platina aberta.

A concentração de grupos amina (mmol/g) nas amostras foi determinada com base em estudos prévios realizados por Oliveira *et al.* (2019). Nesse estudo os autores assumem que os grupos amina são removidos da amostra na faixa de temperatura entre 390–650 °C e que apresentam peso molecular de cerca de 58 g/mol. Neste sentido, eles propuseram a equação (1) para determinação da concentração de grupamentos amina na matriz de sílica:

$$N = \frac{\% \text{ Perda de massa (390 - 650 } ^\circ\text{C)}}{100} \cdot \frac{1\text{mol}}{58\text{g}} \cdot \frac{1000\text{mmol}}{1\text{mol}} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

% Perda de massa (390-650 °C) = Perda de massa avaliada por TGA em temperaturas de 390 a 650 °C.

N= concentração de grupos amina (mmol/g)

A técnica de adsorção e dessorção gasosa (BET) foi utilizada para determinar a área total da superfície, o volume e o tamanho médio dos poros das amostras das nanopartículas. Para tanto, cerca de 100 mg de material foi empregado nas análises usando o equipamento Quantachrome NOVA 1000e (Anton Paar, global). As amostras foram desoxigenadas por 24 h à temperatura de 110 °C por fluxo contínuo de N<sub>2</sub>. Os parâmetros utilizados foram -196 °C como temperatura do banho e 284,7 min do tempo de análise. As análises da área superficial, tamanho de poros e volume total de poros foram obtidas pelo método Barret, Joyner e Halenda (BJH).

A técnica de espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) foi utilizado com a finalidade de determinar o tamanho médio de partículas e o índice de polidispersão (PDI), que é uma medida adimensional da amplitude da distribuição de tamanhos das partículas de uma amostra. Os resultados são expressos na forma de média e desvio padrão de pelo menos três lotes diferentes de cada amostra analisada. Esse ensaio foi conduzido no equipamento Zetasizer Zs da Malvern Instruments (*Malvern*, Inglaterra).

O potencial Zeta das nanopartículas foi avaliado empregando-se a técnica de mobilidade eletroforética das partículas no mesmo equipamento. Para a realização das medidas, 10 mg da amostra foram dispersas em 10 mL de água deionizada (1 mg/mL - pH 7,4) . As amostras foram levadas a um agitador vórtex para melhor homogeneização. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25 °C com laser incidente de 90 ° (retroespalhamento)

### **1.3.2.3. Caracterização morfológica**

A técnica de Microscopia Eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para se obter informações acerca dos aspectos morfológicos das amostras de SBA-16 e APTES-SBA-16. Os testes foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG e as imagens foram adquiridas usando o microscópio Tecnai G2 12 Spirit Biotwin, da FEI Company (Tóquio, Japão) com um potencial de aceleração de 200 kV, com detector para Espectroscopia de Perda de Energia de Elétrons (EELS), com resolução de até 1 eV. As amostras foram dispersas usando água deionizada e sonificadas por 5 min. usando banho de ultrassom. Em seguida, a dispersão obtida foi colocada em grades de cobre revestidas com carbono de 200 malhas. Os ensaios de MET foram realizados 24 horas após a preparação da amostra, permitindo a secagem completa das amostras.

### **1.3.3. Estudo da taxa de incorporação da Doxorrubicina**

O estudo da taxa de incorporação da Doxorrubicina (Glenmark São Paulo, Brasil) foi feita por meio de incubação de uma solução do fármaco contendo as nanopartículas dispersas. Diferentes concentrações de dispersões contendo 10, 20 e 30 mg de SBA-16 e APTES-SBA-16, foram incubadas com soluções do fármaco com concentrações iguais a 100 µg/mL e 200 µg/mL. As amostras foram incubadas sob agitação constante por 48 horas em agitador tipo *shaker* orbital (Nova Ética São Paulo, Brasil), à temperatura ambiente e em seguida foram quantitativamente analisadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O equipamento utilizado nas análises de CLAE foi o VWR HITACHI *Chromaster* (Tóquio, Japão), equipado com detector de DAD (*Diode Array Detector*). Na presente metodologia, se utilizou

a coluna de fase reversa (RP-18) e a fase móvel foi constituída por:

Fase (A): solução tampão acetato (Ácido acético: (Alphatec, São Paulo-Brasil, 99,7 %) (Acetato de sódio anidro: Sigma Aldrich, São Paulo-Brasil, P.A) 0,02 M e pH = 4,6.

Fase (B): acetonitrila (CRQ Produtos Químicos Eireli, São Paulo-Brasil).

Para a quantificação foi necessário construir uma curva de calibração, que foi obtida empregando-se 9 diferentes concentrações de Doxorubicina (200, 150, 100, 80, 60, 40, 20, 10 e 5 µg/mL). Os parâmetros utilizados foram modificados a partir de um método validado conduzido por Sanson e colaboradores (2011). A coluna foi mantida a 25 °C e o porta-amostras manteve os analitos à temperatura de 10 °C. O comprimento de onda de detecção foi de 487 nm e o volume de injeção foi de 20 µl. O fluxo da fase móvel foi eluido isocriticamente em 1,0 mL / min. e a fase móvel durante toda análise, constituiu-se de 50 % de Fase A e 50 % de Fase B.

A taxa percentual de incorporação foi calculada pela diferença entre concentração inicial adicionada de DOXO (Ci) e concentração residual de DOXO (Cr) presente em solução, após o processo de incubação descrito, conforme:

$$\% \text{ de incorporação} = \frac{C_{ix} - CrYx}{C_{ix}} \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

Ci é a concentração inicial de DOXO.

Cr é a concentração residual de DOXO em solução após 48 h.

Y é a massa presente em cada eppendorf.

x é a concentração da DOXO estudada para incorporação.

#### 1.4 Análise Estatística

Os resultados foram calculados e apresentados considerando a média para cada amostra ± o erro padrão da média (média ± DP). A avaliação estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni (Post-hoc), em que  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

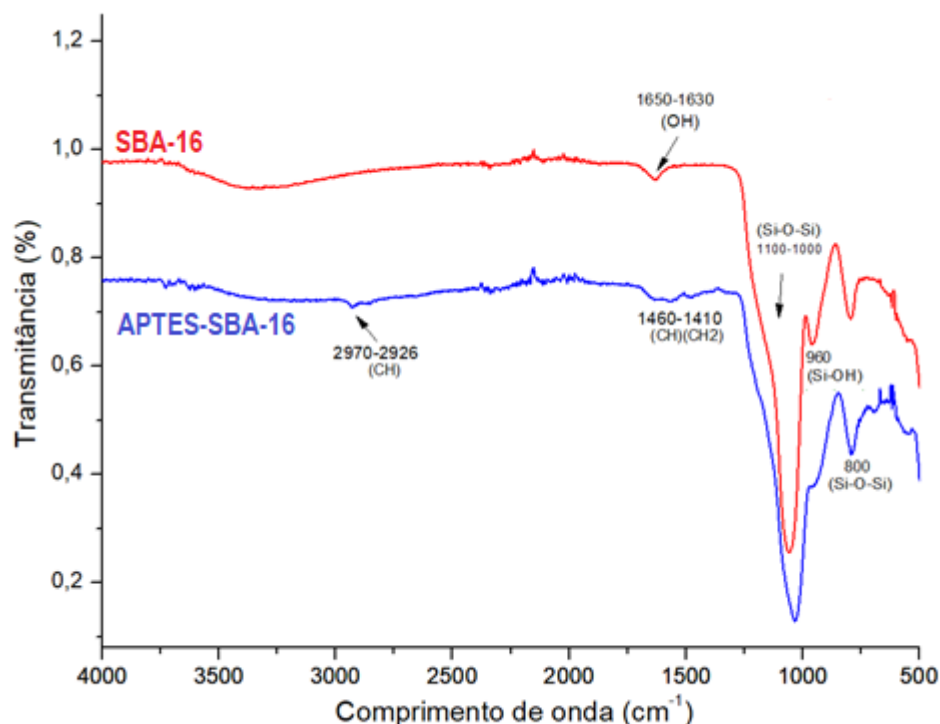
## 1.5. Resultados e Discussão

### 1.5.1. Caracterização química

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi usada para estudar os grupos funcionais presentes em todas as amostras. Tal técnica se baseia na absorção da radiação infravermelha que incide nas amostras, sendo que a luz de comprimento de onda absorvida é característica de cada ligação química presente no material. Portanto, FTIR possui o objetivo de caracterizar qualitativamente as bandas características dos grupamentos químicos presentes nos compostos sintetizados. Nas análises conduzidas nas amostras SBA-16 e APTES-SBA-16, o objetivo foi verificar a presença dos grupos alcoxissilano antes da funcionalização (**Figura 7**) (DOADRIO *et al.*, 2006). É possível observar uma banda estreita com comprimentos de onda variando entre  $1100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento vibracional dos grupos silano (Si-O-Si), os quais estão presentes em ambos os materiais. No comprimento de onda  $960 \text{ cm}^{-1}$ , se localiza uma banda vibracional que foi atribuída a presença de grupos silanol (Si-OH), os quais são consumidos, em grande parte, durante a interação dos alcoxissilanos com a superfície do SBA-16 no processo de funcionalização. Com isso, comparando-se os dois espectros, antes e após a funcionalização, é notável que a intensidade da faixa a  $960 \text{ cm}^{-1}$ , no material funcionalizado diminuiu significativamente. As mesmas bandas também foram observadas no estudo desenvolvido por Guzik e colaboradores (2016). Outra diferença que pode ser observada ao se comparar os dois espectros, é a presença do grupo hidroxila entre  $1650-1630 \text{ cm}^{-1}$  no espectro do SBA-16. Esse grupo está menos intenso no espectro do APTES-SBA-16 devido a adsorção de grupos orgânicos na superfície da sílica após a funcionalização. Outro detalhe é a presença do grupo etílico (CH-CH<sub>2</sub>), através da banda de absorção entre  $1460-1410 \text{ cm}^{-1}$ , a qual foi atribuída as ligações tipo C-C, presente no material funcionalizado. Soares *et al.* (2020), também evidenciaram a banda do grupo etílico na sílica funcionalizada em um recente trabalho.

Considerando os dados obtidos e levando em conta que eles são semelhantes a dados encontrados a trabalhos previamente publicados na literatura, é possível sugerir que a ancoragem APTES ocorreu de forma efetiva e há a formação de grupos Si-O-Si-R no material obtido (ANDRADE *et al.*, 2013).

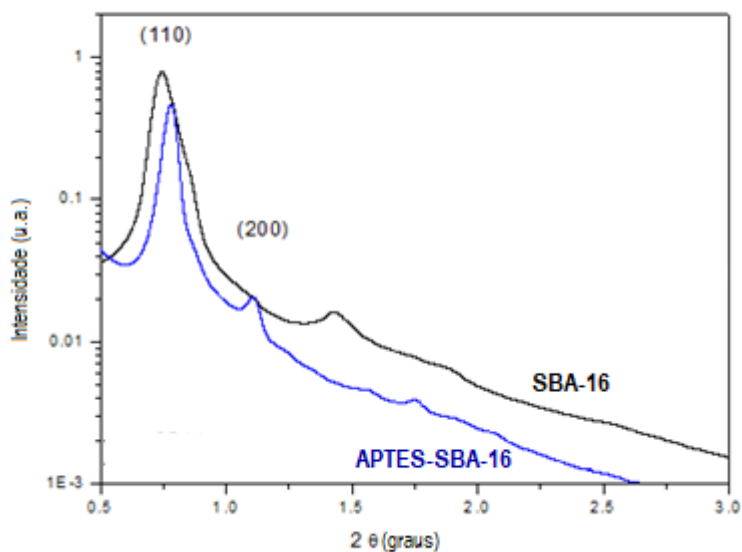
Figura 7: Espectros de FTIR de amostras das matrizes APTES-SBA-16 e SBA-16



O SBA-16 e o APTES-SBA-16 são materiais amorfos em nível atômico, por isso não é possível observar reflexões importantes de difração de raios X em ângulos mais altos em uma análise típica. Assim, por meio da técnica de difratometria de raios em ângulos baixos (SAXS) foi possível visualizar na **Figura 8**, para a matriz SBA-16, três picos padrões nas direções (1 1 0), (2 0 0) e (2 1 0). O pico em (1 1 0) é típico de estruturas mesoporosas e juntamente com o pico em (2 0 0) indicam uma estrutura cúbica de corpo centrado, do grupo espacial Im3m (BALLEM, 2010; AIROLDI, 2014). As amostras SBA-16 que foram funcionalizadas também apresentaram os mesmos picos característicos, garantindo a conservação da mesoestrutura após o processo de funcionalização.

Andrade *et al.*, (2013) também obtiveram difratogramas semelhantes para o APTES-SBA-16. Os picos foram conservados após a funcionalização, porém as pequenas diferenças existentes entre os difratogramas podem ser explicadas devido a adição de substâncias durante o processo de funcionalização, como o APTES, que podem estar incorporadas nos mesoporos ou adicionadas na superfície externa do material, causando um contraste na diminuição geral da densidade de elétrons entre a parede do poro e o poro vazio. Ballem *et al.* (2010) encontraram os mesmos difratogramas para o SBA-16, com os três picos nos planos (1 1 0), (2 0 0) e (2 1 1) na estrutura cúbica do Im3m. Jourshabani *et al.* (2015) também encontraram reflexões nas direções (1 1 0) e (2 1 1).

Figura 8: Estudos de difração SAXS feitos em amostras de SBA-16 (preto) e APTES-SBA-16 (azul)



### 1.5.2. Caracterizações físicas

As análises termogravimétricas foram empregadas para estudar o comportamento das amostras SBA-16 e APTES-SBA-16 sob a atmosfera de ar sintético e taxa de aquecimento definida. As análises foram realizadas para estudar o processo de funcionalização com APTES por meio de diferença de massa entre as amostras dos materiais obtidos (**Figura 9**). Amostras de SBA-16 indicaram, na faixa de temperatura de 30 a 150 °C, perda de massa de 17 %, que foi atribuída a termodessorção de água fisicamente adsorvida. Entre 150 °C e 600 °C, houve a perda de massa de aproximadamente 2 %, que foi atribuída a decomposição do copolímero Pluronic F127, utilizado na síntese do material e possivelmente ainda presente na forma residual (KNOFEL *et al.*, 2007) (**Tabela 1**).

Figura 9: Termogramas de amostras de nanopartículas de sílica funcionalizadas (APTES-SBA-16) e não funcionalizadas (SBA -16), obtidos na faixa de temperatura de 25 a 600 °C.

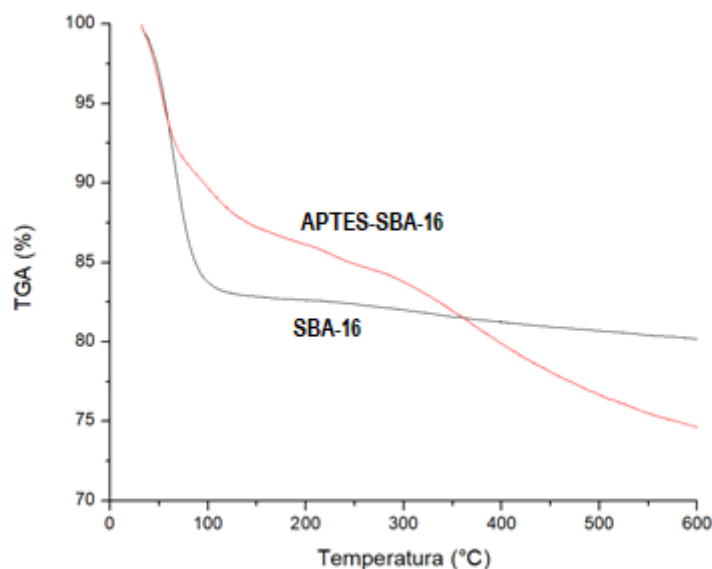


Tabela 1 – Perda de massa referente ao SBA-16 em ciclos térmicos diferentes

Amostra	Faixa de	
	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)
SBA-16	30-150	17
	150-600	2

As amostras de APTES-SBA-16 também indicaram 2 estágios significativos de perda de massa. O primeiro, na faixa de temperatura de 30 °C a 150 °C, que também foi associado a termodessorção da água adsorvida, alcançando de cerca de 11 %. Já o segundo estágio, de 150 °C a 600 °C, mostrou uma perda de massa de 13 %. A perda de massa na faixa de temperatura de 390-650 °C foi avaliada em 6 % (**Tabela 2**), sendo tal valor obtido para ser usado como referência na determinação da concentração de grupos amina nas amostras. Com base nos cálculos utilizados, a concentração de grupos amina foi estimada em 1,03 mmol/g. Comparando-se com outros estudos relatados por Ribeiro *et al.* (2019), essa concentração pode ser considerada baixa. Porém, apesar deste resultado, todos os outros testes de caracterização feitos neste presente trabalho, revelaram a efetiva modificação das MSNs pelo APTES, bem como a presença dos grupamentos amina na superfície do material. Ribeiro *et al.* (2019) obtiveram concentrações maiores de grupos amina, 2.4 mmol/g para a síntese usando metanol na lavagem do material, enquanto quando foi utilizado etanol, foram

encontrados 1.2 mmol/g. Os autores relataram que antes da etapa de funcionalização, as amostras passaram por um processo de ativação de superfície, onde as mesmas foram refluxadas em uma solução de HCl 0,2 M a 80 ° C por 2 h, aumentando assim a concentração de grupos hidroxila. Com o aumento de grupos hidroxila na superfície, é evidente que uma maior concentração de grupos amina podem ser ancorados, o que pode justificar os valores mais elevados encontrados pelos autores.

Tabela 2 – Perda de massa referente ao APTES-SBA-16 em ciclos térmicos diferentes

Amostra	Faixa de Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)
APTES-SBA-16	30-150	11
	150-600	13
	390-650	6

Na comparação entre o SBA-16 e o APTES-SBA-16, para os valores da perda de massa na primeira faixa de temperatura (30 a 150 °C), nota-se que o material funcionalizado perde menos massa que o material puro. Isso pode ser explicado porque a ancoragem de APTES irá reduzir as características de polaridade superficial. A presença da cadeia de grupos amino-alcoxisilanos, no SBA-16 funcionalizado, dá à superfície da parede da matriz de sílica uma característica mais hidrofóbica. Como consequência, a perda de massa, devido a presença de moléculas de água na interface porosa, é menor para o APTES-SBA-16 quando comparado com amostras de sílica SBA-16 não funcionalizadas. Esse resultado é semelhante ao obtido por Andrade *et al.* (2017), que encontraram perda de massa de aproximadamente de 17 % no primeiro estágio de temperatura para o SBA-16 e também evidenciaram uma menor perda de massa após funcionalização do material.

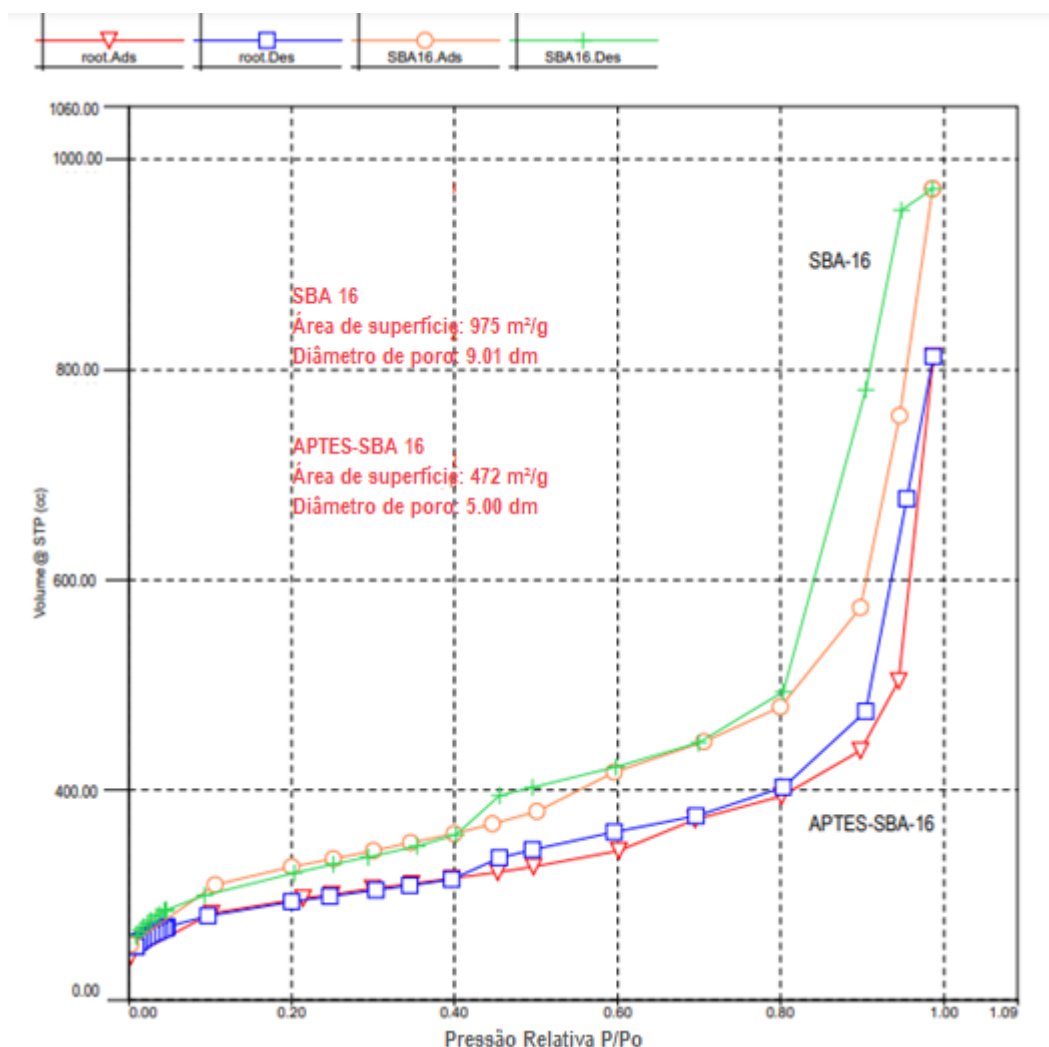
Para o segundo estágio de temperatura (150 °C a 600 °C), nota-se que a perda de massa para o SBA-16 puro foi pouco significativa e muito menor que para o APTES-SBA-16. Esse maior valor para o material funcionalizado foi atribuído à decomposição e perda total dos grupos amino-alcoxisilanos incorporados na matriz do SBA-16. Esses dados também estão de acordo com os estudos feitos por Andrade *et al.*, (2017), que no segundo estágio de aquecimento encontraram valores de perda de massa de aproximadamente 2 % para o SBA-16 e de aproximadamente 14 % de perda de massa para o SBA-16 funcionalizado. Sendo assim, é possível sugerir que os grupos alcoxisilanos estão quimicamente ligados na superfície interna do SBA-16 e apresentam uma estabilidade térmica adequada.



O estudo de adsorção e dessorção gasosa foi realizado pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH), de modo a determinar o volume e o diâmetro médios dos poros das amostras de SBA-16 e APTES-SBA-16. Os resultados estão disponíveis na **Figura 10** e os dados obtidos revelaram uma área superficial significativa de  $975 \pm 6,4 \text{ m}^2/\text{g}$  para as amostras SBA-16, que apresentaram também valores de diâmetro de poros de  $9 \pm 1 \text{ nm}$ . Por outro lado, nessa análise, a matriz APTES-SBA-16 apresentou uma área de  $472 \pm 4,1 \text{ m}^2/\text{g}$  e  $5 \pm 1 \text{ nm}$  de diâmetro de poros. Estes resultados revelam que a metodologia de síntese empregada permitiu obter materiais mesoporosos, uma vez que o tamanho dos poros está entre 5 e 50 nm.

As curvas isotérmicas foram obtidas com coeficientes de correlação de 0,993 e 0,991, para as amostras SBA-16 e APTES-SBA-16, respectivamente e foram correlacionadas com o tipo IV, de acordo com a classificação de isoterma da IUPAC (THOMMES *et al.*, 2015), a qual corresponde a materiais mesoporosos caracterizados por multicamadas.

Figura 10: Análise de adsorção física e química (método BET) para as amostras de SBA-16 (A) e APTES-SBA-16 (B).



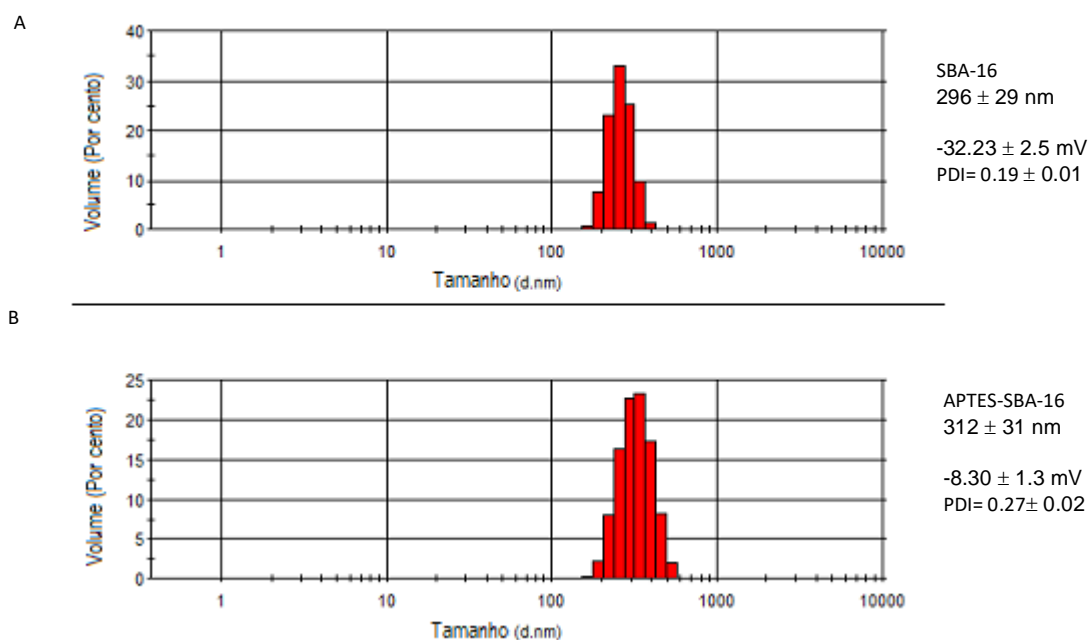
A modificação superficial do SBA-16 com grupos amino-alcoxisilanos promove redução da área superficial e no volume de poros do material, enquanto houve também uma redução significativa no diâmetro dos poros. Com a metodologia de funcionalização empregada, a redução na área superficial foi calculada em torno de 52 % (de 975 para 472 m<sup>2</sup>/g). Essa diminuição ocorre, provavelmente, porque a funcionalização da superfície da sílica acontece preferencialmente nas aberturas de micro/mesoporos, devido ao alto campo potencial nos pequenos poros e à facilidade de fixação na abertura dos poros. Com isso, os grupamentos amino-alcoxisilanos que se ligarem na abertura dos poros podem acabar bloqueando os microporos, levando a uma redução severa da área superficial e do volume dos poros. Goscińska *et al.* (2017) também evidenciaram redução da área

superficial do material após a funcionalização (740 a 220 m<sup>2</sup>/g), porém com a metodologia empregada pelos autores, a redução da área foi 70 % maior. Eles também obtiveram isotermas do tipo IV para os materiais sintetizados.

Os valores obtidos para a distribuição do tamanho das amostras SBA-16 e APTES-SBA-16 estão apresentados na **Figura 11A e 11B** em termos de volume, respectivamente. Os dados revelaram que a síntese do SBA-16 e o método e de funcionalização permitiram obter dispersões monodispersas de nanopartículas onde a matriz de sílica SBA-16 apresentou tamanho médio de  $296 \pm 29$  nm, enquanto a mesma matriz funcionalizada indicou ligeiro aumento de tamanho médio, passando a ser de  $312 \pm 31$  nm. A SBA-16 apresentou índice de polidispersividade igual a  $0,19 \pm 0,01$ , valores que são menores que os obtidos para o material silanizado ( $0,27 \pm 0,02$ ). Um potencial Zeta negativo significativo foi determinado em amostras de SBA-16 ( $-31,45 \pm 2,51$  mV) já para o material funcionalizado obteve-se valores médios de  $-2,76 \pm 0,18$  mV.

Os dados encontrados de tamanho médio de ambas as matrizes revelaram que os materiais produzidos tiveram tamanhos médios em torno 300 nm. Segundos dados da literatura, valores de partículas entre 50 e 300 nm são mais adequados para facilitar a endocitose por células vivas, sendo estas ideais para serem utilizadas como transportadoras de antitumorais por possibilitarem o carregamento do fármaco para o interior das células cancerígenas (ZHOU *et al.*, 2017). O maior valor de PDI para o material funcionalizado pode ser atribuído a uma provável interação química entre grupos amina de diferentes nanopartículas, aumentando assim o perfil de aglomeração entre elas.

Figura 11: Distribuição do tamanho, tamanho médio, índice de polidispersividade das nanopartículas (A) SBA-16 e (B) APTES-SBA-16.



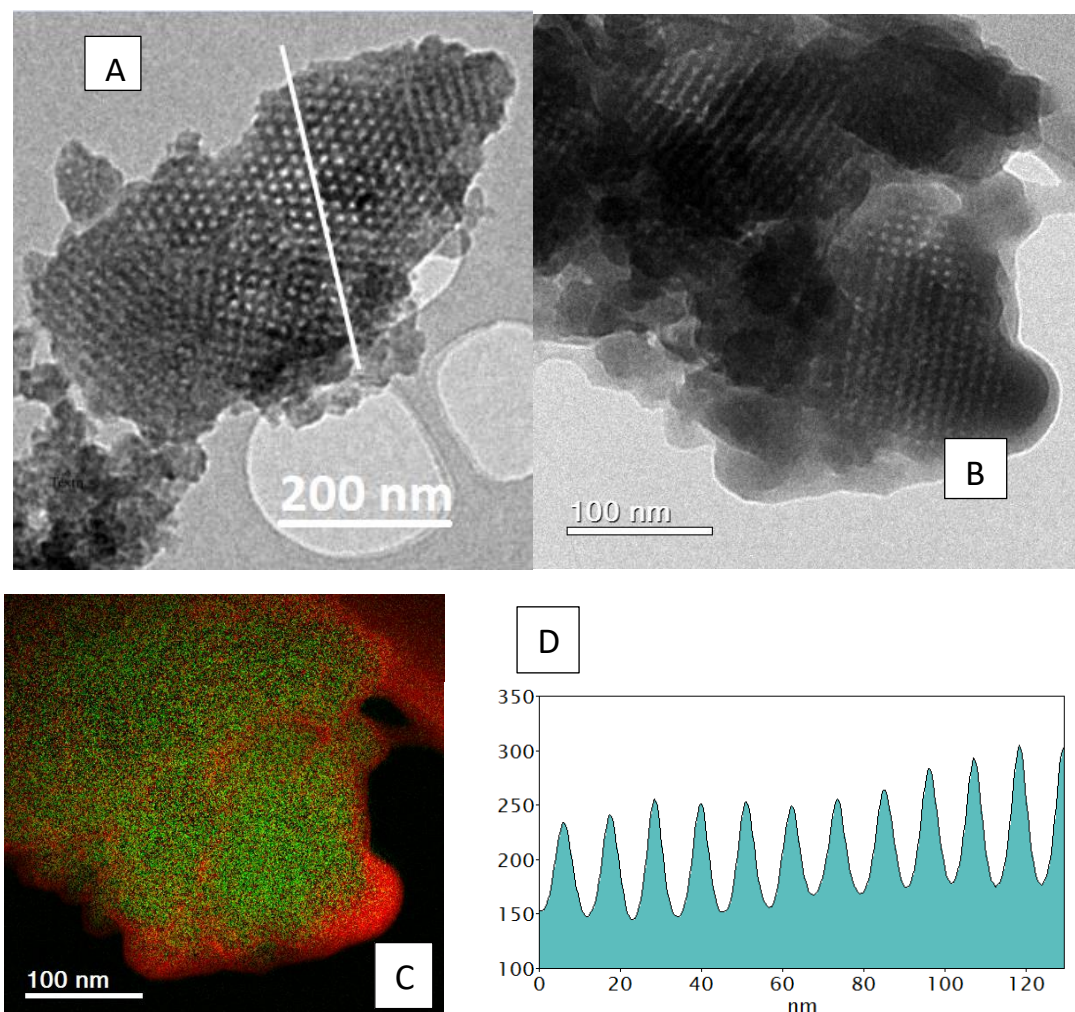
O alto valor em módulo apresentado para o potencial Zeta do SBA-16 pode ser atribuído ao grande número de grupos silanóis desprotonados localizados nas superfícies de nanopartículas de sílica devido ao balanço químico com a água. No entanto, após o processo de silanização, as amostras APTES-SBA-16 apresentaram importante redução em módulo do potencial Zeta negativo. Essa mudança pode ser atribuída os grupos alcoxissilanos-amina imobilizados na superfície da matriz de sílica durante o processo de funcionalização (ANDRADE *et al.*, 2013). Os grupamentos amina, no pH testado, possuem quantidades significativas de espécies protonadas que podem reduzir significativamente o potencial Zeta das nanopartículas. Lagarrigue *et al.* (2020) encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Eles também encontraram valores abaixo de 0,3 para o índice de polidispersividade, caracterizando sistemas monodispersos. Em relação aos valores do potencial Zeta, também houve uma redução significativa em módulo para as amostras funcionalizadas com APTES e um tamanho de partícula próximo a 350 nm para as nanopartículas de sílica SBA-16.

### 1.5.3. Caracterização morfológica

Nas Figuras **12A e 12B** estão apresentadas micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as amostras de (A) SBA-16 e (B) APTES-SBA-16. Os resultados revelaram uma ordenação bem definida de poros da matriz, característica típica de materiais mesoporos como o SBA-16. As imagens das amostras APTES-SBA-16 não mostraram diferença significativa no espaçamento entre os canais da sílica SBA-16, demonstrando que a estrutura ordenada é preservada, o que é desejável para os objetivos propostos neste trabalho. No entanto, é possível notar que há certa diferença no aspecto da região da extremidade e superfície da amostra referente ao APTES-SBA-16, o que pode evidenciar a modificação do material após a funcionalização. Essa comprovação foi realizada nessa técnica, utilizando-se a espectroscopia de perda de energia por elétrons (EELS).

Quando elétrons incidem sobre um material, os mesmos realizam transições eletrônicas específicas deslocando-se em direção a amostra com uma determinada energia, enquanto ao se chocarem com a amostra, a qual possui uma determinada composição, parte da energia desses elétrons são transformadas em transições eletrônicas. Com essa técnica, foi possível avaliar a energia dos elétrons de átomos de nitrogênio retroespalhados a partir da amostra, uma vez que apenas após a efetiva funcionalização, a mesma passa a possuir grupamentos amino em sua estrutura. Assim, na **Figura 12C** está disponível a micrografia da matriz APTES-SBA-16 obtida pela técnica de EELS. É possível notar que os átomos de oxigênio estão representados na cor verde e os átomos de nitrogênio, pertencentes aos grupos APTES, podem ser evidenciados pela cor vermelha, ocupando toda a matriz de sílica. A análise do perfil da ordenação dos poros referente ao SBA-16 foi feita através do software ImageJ<sup>®</sup> e os resultados estão disponíveis na **Figura 12D**, onde os picos representam o centro dos poros. A distância calculada entre os picos revelou um valor médio de aproximadamente 11 nm, o que está de acordo com os dados obtidos pelo método BET, em que o diâmetro médio dos poros foi determinado como sendo em torno de 9 nm.

Figura 12: Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das amostras (A) SBA-16, (B) APTES-SBA-16. Em (C) está representada a espectroscopia de perda de energia eletrônica (EELS) do APTES-SBA-16 evidenciando os átomos de nitrogênio na cor vermelha. Em (D) está disponível a análise do perfil da ordenação da matriz do SBA-16 [linha branca na imagem (A)] feita pelo software Image J<sup>®</sup>.



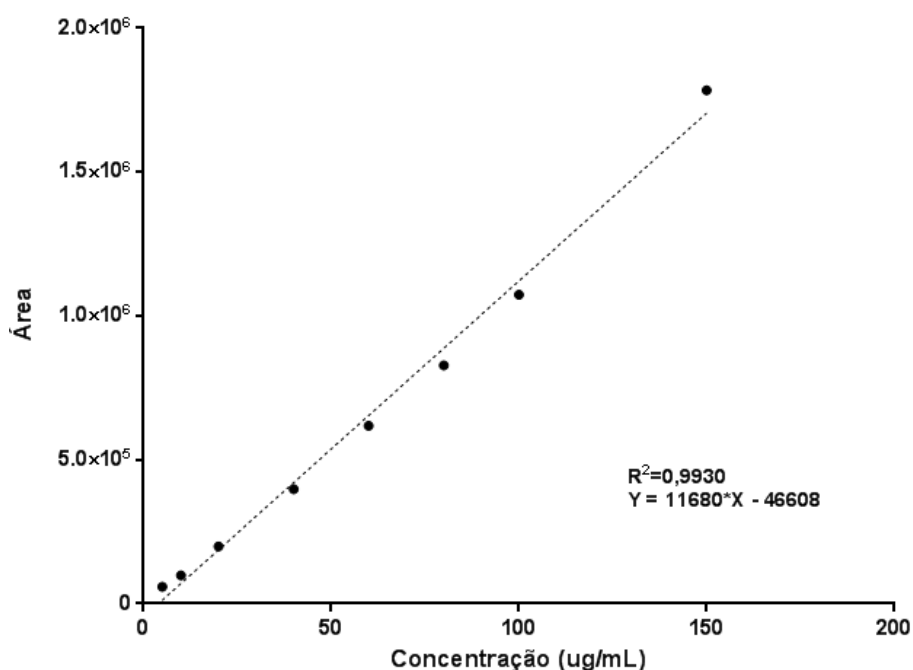
Como evidenciado nos dados obtidos, a superfície da matriz SBA-16 foi efetivamente modificada com o acoplamento de moléculas de APTES e a presença desse grupo reativo (grupamento amino-terminal) possibilita que reações químicas possam ser processadas na superfície do material, permitindo, por exemplo, a adição de polímeros sintéticos. Na literatura, é possível encontrar diversos artigos que relatam a obtenção de materiais híbridos de sílica e polímeros, sendo a funcionalização da sílica uma etapa de grande importância para a efetiva aquisição do material desejado. Como exemplo, pode-se citar: o estudo realizado por Lagarrigue (2020), no qual o poli (D, L-lactídeo) foi graftizado

na superfície de nanopartículas de sílica funcionalizadas com APTES, o estudo realizado por Coutinho (2014), onde a superfície das MSNs modificadas com APTES foi revestida de polímeros PEG-acrilatos, além do estudo feito por Ma *et al.* (2017) em que foi possível se obter um material híbrido de SBA-15-APTES revestido de poli(metacrilato de metila). Ambos os materiais obtidos possuem uma longa estrutura de poros ordenada e de tamanho homogêneo. Neste sentido esses materiais podem ser considerados adequados para incorporar e liberar uma grande variedade de moléculas de ativos e, portanto, podendo atuar como sistemas de liberação controlada de fármacos. Além disso, essa estrutura apresenta menor suscetibilidade ao bloqueio dos canais internos e assegura a acessibilidade dos poros em qualquer direção. Dessa forma, eles acabam permitindo um melhor controle cinético do encapsulamento e liberação de fármacos (ZHOU *et al.*, 2017 e OLIVEIRA, 2013).

#### **1.5.4. Estudo da taxa de incorporação da doxorrubicina**

A técnica de CLAE-DAD foi usada para analisar a quantidade de DOXO incorporada nas amostras SBA-16 e APTES-SBA-16. Inicialmente, foi preparada uma curva de calibração onde a faixa de concentração variando entre 5 a 200 µg/mL foi empregada. A curva obtida está apresentada na **Figura 13** e os dados obtidos revelaram que um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) igual a 0,993 foi obtido. Segundo a RDC 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicada no DOU nº 141, de 25 de julho de 2017, recomenda-se que as curvas de calibração para métodos analíticos de fármacos, incluindo a técnica de CLAE deve possuir valores de  $r^2$  de no mínimo 0,99 ou mais próximos de 1. Recomenda-se também que a curva possua pelo menos 5 padrões de diferentes concentrações. Os dados obtidos atendem a ambas as recomendações sendo, portanto, considerada adequada para os estudos de quantificação de DOXO.

Figura 13: Curva de calibração de doxorubicina na faixa de 5 a 200 µg/mL obtida por meio da técnica de CLAE-DAD.

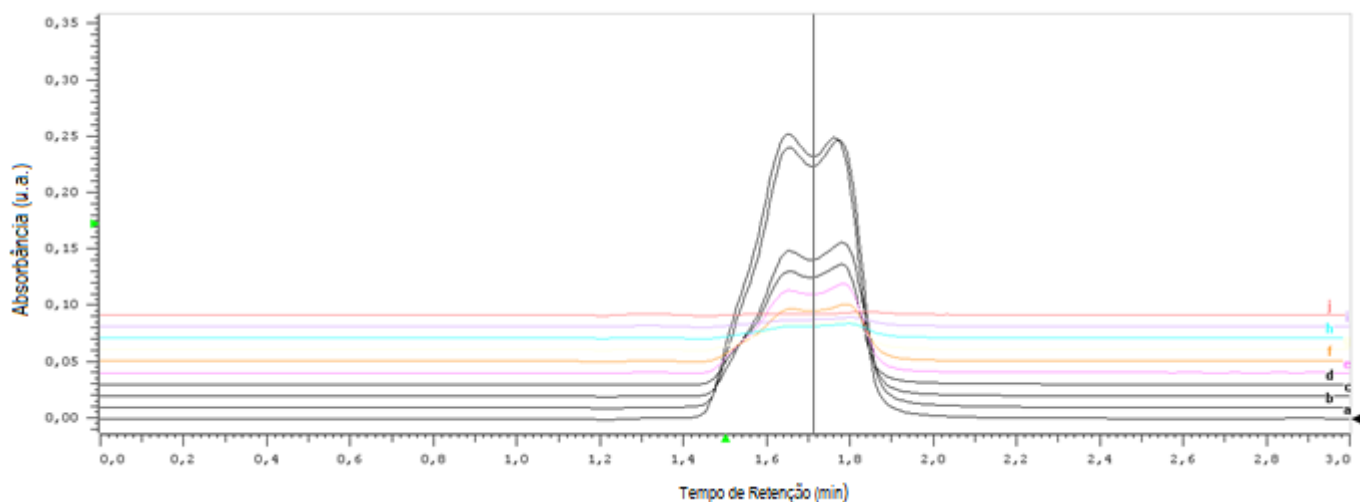


O conjunto de cromatogramas disponível na **Figura 14** foi obtido após a análise de amostras padrão de DOXO que foram usadas para construir a curva de calibração. A assimetria dos picos foi atribuída ao fato do padrão empregado ser constituído de uma mistura de epímeros constituídos de Epirrubicina e Doxorubicina e o método desenvolvido, baseado no uso de uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> não foi capaz de separar de forma eficiente ambas as moléculas, conduzindo a discreto alargamento da base do pico e a assimetria observada.

Sabe-se que quanto maior o alargamento dos picos, menor será a eficiência na separação entre duas substâncias que eluem próximas, sendo ideais os picos simétricos com uma pequena base e que um cromatograma com boa resolução é aquele em que os picos estão mais separados e todos os picos finalizam na linha de base antes de iniciar um novo pico (SILVA, 2012). Por isso, é possível dizer que o cromatograma gerado não apresentou elevada simetria. Devido ao ocorrido, tentou-se ajustar parâmetros como pH, molaridade e a proporção de uma fase móvel em relação a outra, além da troca de coluna durante o experimento. Porém, após realizar as análises várias vezes variando-se os diversos parâmetros, no intuito de melhorar a simetria dos picos, não houve melhoria do aspecto dos mesmos.

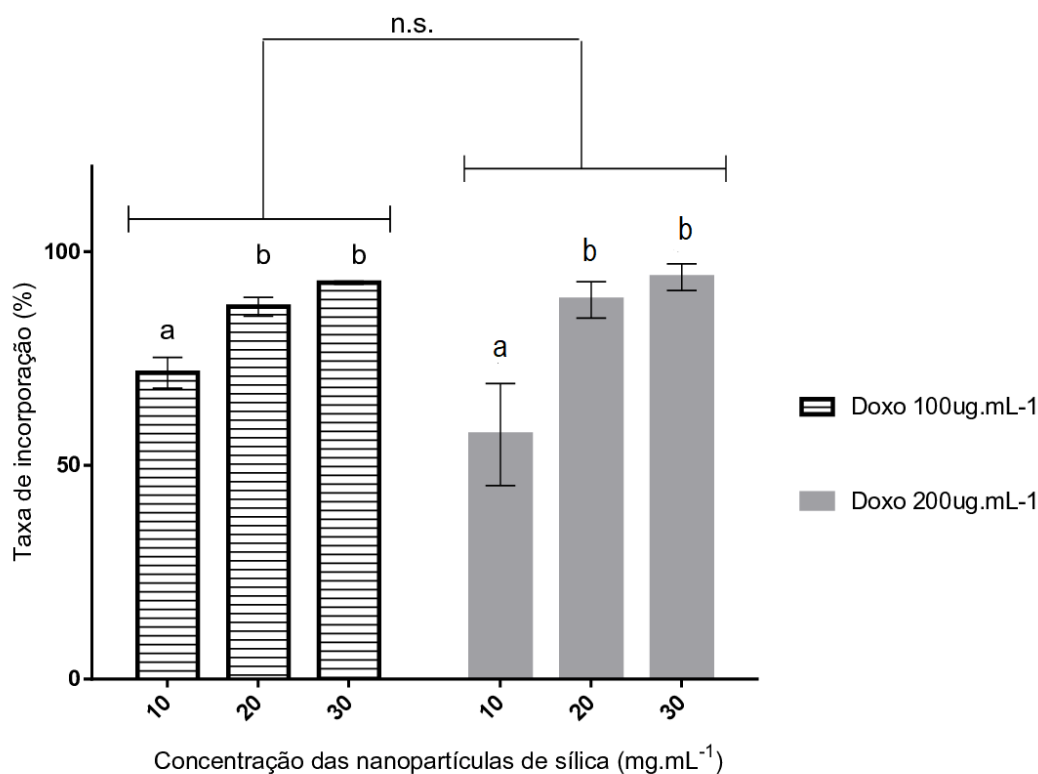


Figura 14: Cromatograma que representa o tempo de retenção fármaco Doxorrubicina.



Após 48 h de incubação de diferentes concentrações de dispersões de SBA-16 (10, 20 e 30 mg/mL) com diferentes concentrações de Doxorrubicina (100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), alíquotas dos sobrenadantes das amostras foram retiradas e analisadas por meio da técnica de CLAE-DAD. Os resultados obtidos estão disponíveis na **Figura 15** os quais revelam que as melhores taxas de incorporação foram obtidas quando se empregou amostras de SBA-16 nas concentrações de 20 e 30 mg/mL, independentemente da concentração de DOXO. Quando a concentração do fármaco foi de 100  $\mu\text{g/mL}$ , a dispersão de 10 mg de sílica apresentou redução estatisticamente significativa quanto a taxa de incorporação da DOXO em relação as dispersões com 20 e 30 mg de sílica. O mesmo comportamento foi observado nas amostras que ficaram em contato com a solução de DOXO na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Avaliando-se todos os dados entre os grupos, é possível dizer que não há diferença estatística entre os dados obtidos para as amostras que ficaram em concentrações diferentes de DOXO. Pode-se afirmar que as amostras de SBA-16 na concentração de 20 mg/mL, incubadas com o fármaco na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , apresentaram o melhor desempenho na relação custo versus benefício, alcançando taxa de 87 %. Essa alta taxa de incorporação pode ser explicada pela extensa área superficial que foi obtida para este material ( $\sim 970 \text{ m}^2/\text{g}$ ) e também pela interação dos grupos silolís com a DOXO. VIERA (2015) sintetizou amostras de SBA-16 e realizou estudos de incorporação do fármaco INDOL-3-CARBINOL. Nesses estudos, o autor não observou taxas de incorporação muito significativas (em torno de 30 %). Isso provavelmente foi devido a divergências quanto a metodologia empregada na síntese do material e diferentes interações químicas entre a sílica e o fármaco utilizado nesse trabalho.

Figura 15: Resultado dos estudos da taxa de incorporação de DOXO em diferentes concentrações (100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em matrizes SBA-16 também em diferentes concentrações (10, 20 e 30  $\text{mg}/\text{mL}$ ). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ao nível de  $P < 0.05$ . A sigla n.s. significa que não há diferença estatística entre os grupos comparados por meio de análise de variância (ANOVA).



Seguindo a mesma metodologia, diferentes dispersões de APTES-SBA-16 (10, 20 e 30  $\text{mg}/\text{mL}$ ) foram incubadas por 48h com diferentes concentrações de doxorrubicina (100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As alíquotas dos sobrenadantes das amostras foram retiradas e analisadas por meio da técnica de CLAE e os resultados apresentados na **Figura 16**. Os dados obtidos revelam que as diferentes dispersões de APTES-SBA-16 que ficaram em contato com a solução de DOXO à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , não apresentaram diferença significativa quanto a taxa de incorporação do fármaco. Sendo assim, sugere-se que alterar a quantidade de sílica funcionalizada não interfere na taxa de incorporação do fármaco nessa concentração. Quando houve o emprego do fármaco na concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a dispersão de 10  $\text{mg}$  de sílica apresentou redução estatisticamente significativa quanto a taxa de incorporação da DOXO, em relação as dispersões com 20 e 30  $\text{mg}$  de sílica. Após a avaliação dos dados obtidos entre os grupos, foi possível inferir que só há diferença estatística entre os dados obtidos para as suspensões de 10  $\text{mg}$  de sílica funcionalizada. Sendo assim, pode-se afirmar que as amostras de APTES-SBA-16 na concentração de 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , incubadas com o fármaco na

concentração de 100 ug/mL apresentaram o melhor desempenho na relação custo versus benefício alcançando taxa de 29 %.

Entre os dados obtidos, a maior de taxa de incorporação para o APTES-SBA-16 foi de 52 %. Andrade *et al.* (2017) avaliaram a taxa de incorporação de Ciproflaxino no APTES-SBA-16 e os resultados indicaram uma taxa de incorporação de aproximadamente 28 %, o que significa uma taxa apenas moderada.

A influência do processo de funcionalização na taxa de incorporação do fármaco nas matrizes de sílica foi avaliada e os resultados estão disponíveis na **Figura 17**. Em todos os testes, as amostras não funcionalizadas (SBA-16) apresentaram melhores taxas de incorporação.

Figura 16: Estudo da taxa de incorporação de DOXO em diferentes concentrações (100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) em matrizes APTES-SBA-16 nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/mL. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ao nível de  $P < 0.05$  (ANOVA).

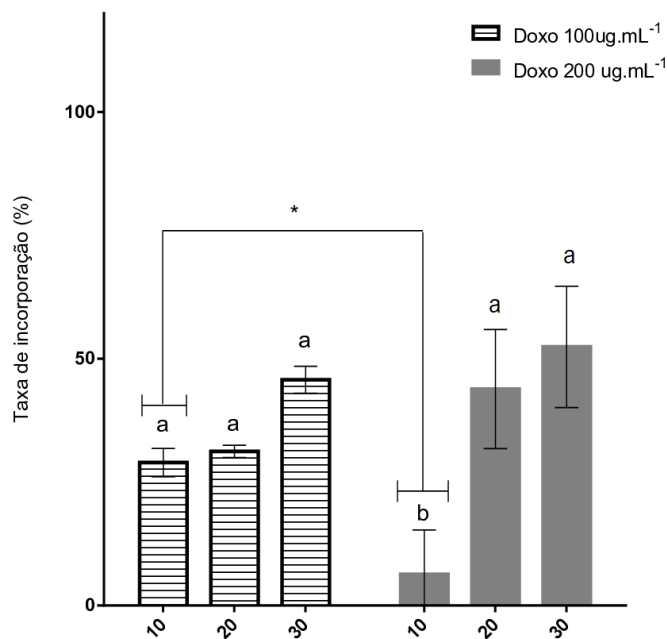
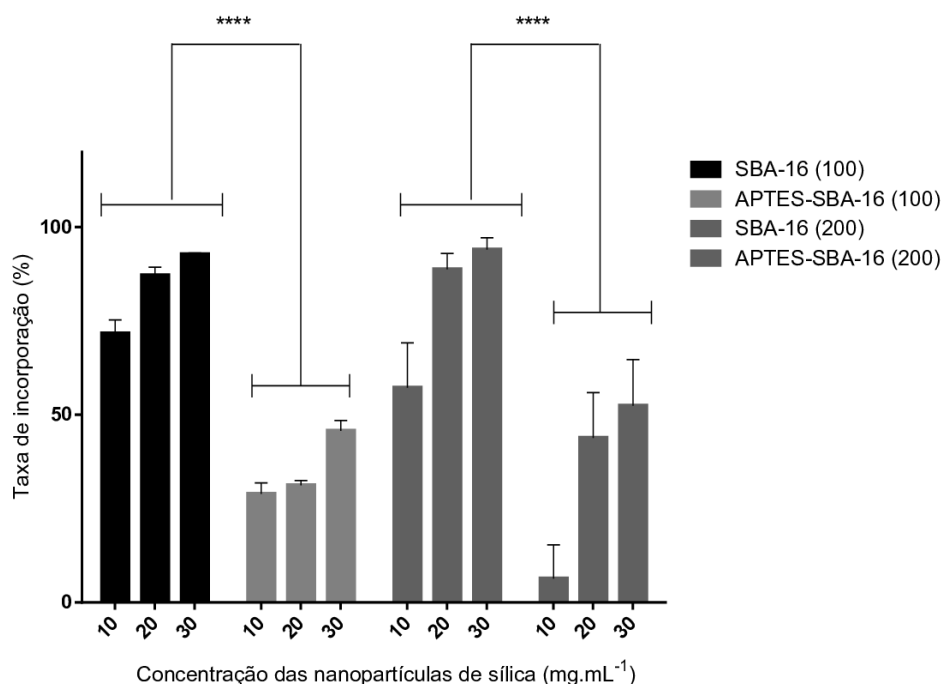


Figura 17: Estudo da taxa de incorporação de DOXO em diferentes concentrações (100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) tanto das matrizes SBA-16 como nas matrizes APTES, ambas em diferentes concentrações (10, 20 e 30  $\text{mg/mL}$ ). Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ao nível de  $P < 0.05$  (ANOVA).



O processo de funcionalização da matriz SBA-16 foi determinante na redução na taxa de incorporação da DOXO, independente da concentração do fármaco. As amostras não-funcionalizadas foram capazes de incorporar o fármaco em quantidades significativamente maiores, alcançando uma taxa até 51 % maior. Esse comportamento pode ser atribuído a redução de área superficial da matriz de sílica pela presença dos grupos alcóxissilanos. Os resultados também evidenciaram a diferença na afinidade dos substratos pelo fármaco, devido a funcionalização da sílica com APTES. Esses grupamentos são citados na literatura como grupos que ajudam a modelar a eficiência e incorporação, bem como a cinética de liberação de diferentes compostos com base em sua capacidade de modificar a característica superficial, reduzindo a ação das ligações de hidrogênio, e incrementando as forças de van der Waals entre a superfície da sílica e grupamentos apolares do fármaco. Porém, apesar do material funcionalizado incorporar uma quantidade menor de DOXO, ele foi capaz de alcançar  $2,9 \mu\text{g}$  de DOXO/  $\text{mg}$  do carreador, adsorvendo quantidades satisfatórias do fármaco, comparando-se com dados já citados por outros autores, os quais também abordam incorporação de bioativos em nanocarreadores.

Andrade e colaboradores (2013) também estudaram a taxa de incorporação de Atenolol nas nanopartículas do SBA-16 e do APTES-SBA-16. A sílica não funcionalizada (SBA-16), quando comparada com a modificada com APTES, apresentou maior taxa de incorporação de Atenolol de cerca de 21 % e 8 %, respectivamente. Tais resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, uma vez que o SBA-16 possui mais espaços disponíveis devido à falta de agentes de funcionalização. Desse modo, é esperado que a sílica não funcionalizada seja capaz de incorporar maior quantidade de fármaco. Naghiloo *et al.* (2015) também desenvolveram estudos com a sílica SBA-16 e funcionalizada com APTES. Os autores usaram o fármaco Ibuprofeno como modelo para incorporação em ambos os materiais. É interessante citar que eles obtiveram dados que mostram que a matriz SBA-16 amino-modificada exibiu maior capacidade de incorporação do fármaco (63 %) em relação ao material não modificado com APTES (56 %). Embora o APTES-SBA-16 possua menor tamanho e volume de poros e menor área superficial, esse sistema foi capaz de incorporar maior quantidade de fármaco. Esse resultado, que não era esperado, ocorreu provavelmente, devido à ligação de hidrogênio de grupos silanois presentes nas paredes dos poros com o grupo carboxila do fármaco Ibuprofeno, favorecendo a interação SBA-16-fármaco e promovendo maior taxa de incorporação.

## CAPÍTULO 2

### OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE

### SÍLICA-POLÍMERO

#### 2. Considerações gerais

As nanopartículas híbridas inorgânicas-orgânicas geralmente consistem em um núcleo sólido e inorgânico interno cercado por um invólucro polimérico. Alguns exemplos típicos para a parte interna são  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  além de outros óxidos de metais de transição. Em geral, o invólucro é baseado em polímeros, que assim como o núcleo sólido, são escolhidos de acordo com a aplicação desejada (HÜBNER *et al.*, 2010). Nos últimos anos, houve um interesse crescente na fabricação de nanopartículas híbridas para aplicações biomédicas e muitos projetos têm focado no emprego de nanopartículas de sílica, devido as suas características de elevada área superficial e superior biocompatibilidade (DU *et al.*, 2015). Nestes trabalhos a sílica é usada como partícula central, na qual é possível incorporar um fármaco (BISSADI; WEBERSKIRCH, 2016). Dentre os diferentes polímeros usados como revestimento, os que respondem a estímulos são os mais interessantes para seu uso em tratamentos de doenças, como o câncer. Ao se utilizar essa classe de polímeros, se obtém uma nanoestrutura projetada para liberar o fármaco em um local apropriado, de acordo com a resposta ao estímulo aplicado. Sendo assim, é possível aumentar a eficiência dessas nanoestruturas ao permitir a entrega aprimorada de agentes terapêuticos nas áreas patológicas (ALSEHLI, 2020). Nanopartículas híbridas podem ser preparadas por técnicas eficientes de polimerização controlada, como a polimerização radicalar por transferência de átomos (do inglês - *Atom Transfer Radical Polymerization* - ATRP), que permite processos de polimerização com um grau preciso de substituição (DU *et al.*, 2015). Neste ínterim, o objetivo deste capítulo foi sintetizar e caracterizar física e quimicamente um material híbrido inorgânico-orgânico (sílica-polímero), por meio da graftização da sílica funcionalizada com um copolímero termossensível baseado em PVCL e PNIPAAm, por meio da técnica ATRP.

#### 2.1. Fundamentação teórica

##### 2.1.2 Nanopartículas híbridas de sílica-polímero

O uso de nanopartículas, como a sílica, vem contribuindo consideravelmente para a melhoria no tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer. Porém, algumas aplicações continuam sendo um desafio, como por exemplo, no que se diz respeito ao carregamento de fármacos de forma mais específica até o local alvo de sua liberação. Com isso, a obtenção de nanopartículas híbridas pode

melhorar significativamente as características das nanopartículas já existentes e superar este tipo de desafio. A utilização da combinação das propriedades ótimas da sílica mesoporosa com as propriedades de capacidade de reação a estímulos dos polímeros inteligentes, ou responsivos, resulta em um material híbrido que pode ser utilizado de forma eficiente para aplicações em patologias clínicas, como o câncer.

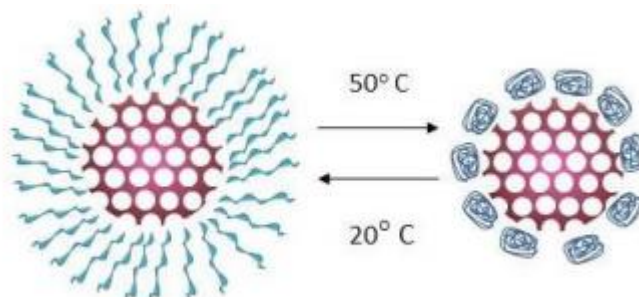
Os polímeros responsivos são caracterizados por responderem a estímulos, que podem ser classificados em três diferentes categorias:

- (i) Estímulos físicos (luz, temperatura, ultrassons);
- (ii) Estímulos químicos (solvente, redox, pH);
- (iii) Estímulos biológicos (enzimas, receptores).

Polímeros termossensíveis têm atraído grande atenção em aplicações em bioengenharia e biotecnologia, pois têm a capacidade de responder a uma mudança de temperatura, podendo ser usados em amplas aplicações, atraindo grande interesse científico. Esses polímeros possuem pontos críticos no qual as interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre as cadeias poliméricas e o meio aquoso alteram-se rapidamente com a mudança da temperatura. Neste ponto crítico denominado de “temperatura crítica inferior de solubilidade” (do inglês *Lower Critical Solution Temperature*, LCST), as cadeias poliméricas sofrem contração com o aumento da temperatura acima desse ponto crítico. Por outro lado, outros polímeros apresentam a chamada “temperatura crítica superior de solubilidade” (do inglês *Upper Critical Solution Temperature*, UCST) onde as cadeias poliméricas sofrem contração ao serem arrefecidas abaixo dessa temperatura. (LIECHTY, 2012). Quando o meio está em temperaturas inferiores à temperatura crítica, as ligações de hidrogênio formadas entre os segmentos hidrofílicos da rede polimérica e as moléculas de água são favorecidas, promovendo assim a sua expansão. Com o aumento da temperatura acima da temperatura crítica, as interações entre os segmentos tornam-se mais fortes, e as ligações de hidrogênio se rompem. Isso leva à contração do polímero, resultando num estado onde as interações polímero-polímero e solvente-solvente são preferenciais (**Figura 18**).

O poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) e o poli (Vinilcaprolactama) (PVCL), estão entre a classe de polímeros termossensíveis, ambos com LCST em torno de 32°C, a qual é um pouco abaixo da temperatura do corpo humano. Esta temperatura pode ser ajustada por meio da incorporação de segmentos hidrofílicos, como por exemplo, sílica (COUTINHO, 2014).

Figura 18: Esquema do comportamento esperado de um polímero termossensível submetido à diferentes condições de temperatura. Adaptado de: COUTINHO, 2014.



### 2.1.3 Polimerizações radiculares controladas “vivas”

As polimerizações radiculares convencionais (PRC) são caracterizadas por serem reações que promovem a formação de cadeias poliméricas sem controle sobre o comprimento da cadeia. Isso ocorre devido a alta concentração de espécies radiculares no meio, as quais propiciam alta taxa de terminações irreversíveis (**Figura 19**). Essas polimerizações ocorrem em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. Em todas essas etapas estão envolvidos mecanismos e velocidade reacional diferentes. (ref. Fernanda M. B. Coutinho e Clara M.F. Oliveira. Reações de Polimerização em Cadeia. Editora : Interciência, 2006).

Figura 19: Representação simples de uma reação de polimerização radicalar convencional. Adaptado de: MURARO, 2014.



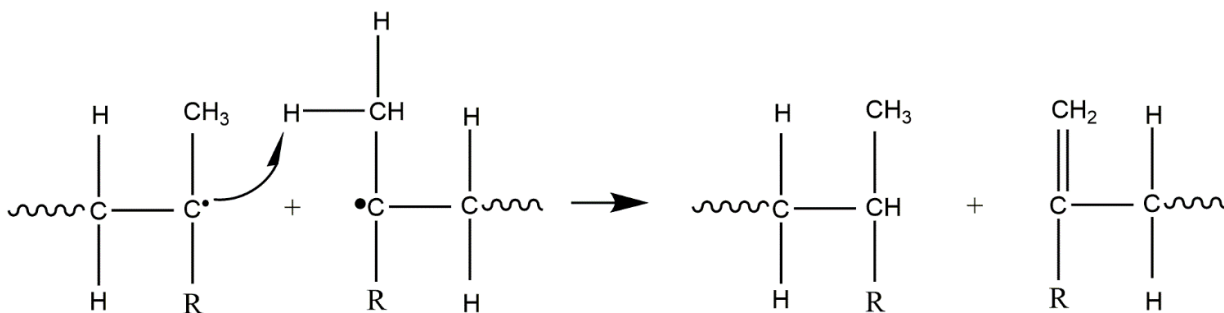
A iniciação consiste na decomposição do iniciador, com a posterior adição do monômero (M) à cadeia. A propagação das cadeias é a fase do crescimento da macromolécula e envolve a adição sequencial de unidades monoméricas ao radical  $P_n\bullet$  formado.

A etapa de terminação, dependendo do sistema reacional em si, pode ocorrer de várias maneiras:  
i) *Por transferência de cadeia*: Em geral, o término prematuro de uma cadeia polimérica em crescimento ocorre pela transferência de átomos de hidrogênio ou outros, ou ainda quaisquer espécies (fragmentos de moléculas, etc) para o radical do polímero. Isso pode ocorrer a partir de qualquer



espécie presente no sistema, podendo ser monômero, iniciador, solvente ou impurezas, conforme o caso. Quando isso ocorre em altas taxas, são observadas massas molares menores do que as previstas teoricamente. ii) *Terminação por acoplamento ou combinação entre 2 radicais poliméricos em crescimento*. Esse tipo de terminação ocorre preferencialmente por envolver menos energia (a menos que o tamanho do radical “R” o impeça). Em qualquer dos casos, ocorre a desativação da macromolécula em crescimento de modo irreversível. Isso faz com que os materiais poliméricos obtidos apresentem baixo ou nenhum controle do comprimento da cadeia e larga polidispersidade (ODIAN, 2004). Um exemplo do processo de terminação por desproporcionamento está mostrado na **Figura 20**.

Figura 20: Processo de terminação por desproporcionamento. Adaptado de: GONÇALVES, 2006.



As polimerizações radiculares não necessitam serem realizadas em condições extremas como, em total ausência de umidade, monômeros rigorosamente puros e atmosfera estritamente inerte. Porém, existe a limitação da falta de controle quanto a formação de polímeros bem definidos, quanto a massa molar, grau de dispersidade, composição, arquitetura das cadeias e funcionalidade de sítios específicos desses polímeros (MURARO, 2014). Para superar essas limitações surgiram as polimerizações radiculares controladas “vivas” (GRACIA, 2005).

Mecanicamente, as PRC se distinguem das polimerizações via radical livre controlada/viva (PRV), devido à existência de um processo de ativação reversível. Nas PRCs, as cadeias poliméricas atingem tamanhos elevados logo no início da reação. Já nas PRVs, as cadeias poliméricas são controladas e vão crescendo lentamente com o tempo. As PRVs se desenvolvem em cinco etapas: iniciação, propagação, terminação, transferência de cadeia e reação de ativação-desativação (mantendo a cadeia polimérica dormente e ativa reversivelmente) (GONÇALVES, 2006). Existem diferentes processos de polimerizações vivas, como:

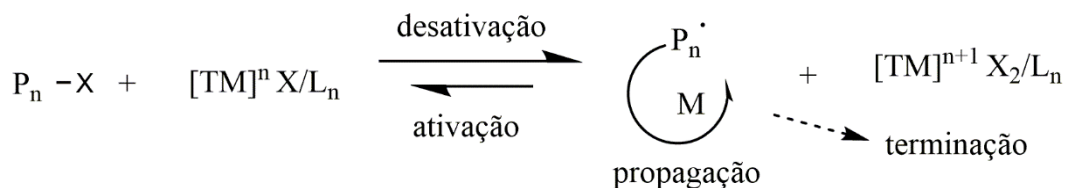
- (i) polimerização radical mediada por nitróxidos (NMRP),
- (ii) polimerização via radical por transferência de átomo (ATRP),

(iii) Polimerização via transferência reversível por adição-fragmentação (RAFT), entre outros processos de transferência degenerativa (GURNANI, 2020).

Com as PRVs é possível sintetizar macromoléculas com arquiteturas complexas, massa molares predeterminadas e baixa dispersão, ou seja, materiais com características bem definidas. Tais materiais podem ser especialmente importantes para aplicações terapêuticas, uma vez que o controle total sobre a massa molar e suas distribuições permite uniformidade nas propriedades finais do material. Entre as PRV, a polimerização por transferência de átomo (ATRP) é uma das técnicas mais amplamente estudada, devido à sua compatibilidade com uma ampla variedade de monômeros e tolerância a condições reacionais. Esse processo polimérico conta com os seguintes componentes: Iniciador, sistema catalítico (sais de metais de transição/ligante), monômero e solvente (AVERICK *et al.*, 2012).

O mecanismo tradicional ATRP, utiliza um iniciador que sofre clivagem homolítica da ligação C (sp<sup>3</sup>)-X (onde X = Br ou Cl) , mediado por um metal de transição como catalisador (**Figura 21**). O catalisador metálico, após ser oxidado, pode desativar reversivelmente o radical em propagação da cadeia polimérica transferindo o halogênio para o final da cadeia em propagação, transformando essa espécie em “dormente”, ou seja, desativada temporariamente. Essa desativação reversível, impõe controle sobre o processo de polimerização, diminuindo a quantidade de radicais ativos na solução (MESSINA *et al.*, 2019). É importante salientar que o equilíbrio sempre está voltado para as espécies dormentes, em outras palavras, a constante de desativação deverá ser maior do que a constante de ativação para garantir uma baixa concentração de espécies ativas no meio reacional e assim permitir o controle no comprimento da cadeia. O papel do ligante é complexar e solubilizar o catalisador (sal de metal de transição, em geral insolúvel em meio orgânico), ajustando sua atividade durante o processo. A escolha do ligante influencia muito na eficácia do catalisador e permite o controle sobre a homogeneidade ou heterogeneidade do meio polimérico, influenciando no equilíbrio dinâmico entre espécies ativas e dormentes. Ligantes à base de nitrogênio são comumente empregados em sistemas de catalisador ATRP mediados por Cu. Estes incluem derivados de bipyridina (bpy), piridina imina, dietilenotriamina (DETA), tris [2-aminoetil] amina (TREN), pentametildietilenotriamina (PMDETA), tetraazaciclotradecano entre outros (CYCLAM16), (TANG *et al.*, 2006) (ZORVARYAN *et al.*, 2011) (TSANG, 2012).

Figura 21: Descrição do mecanismo geral da polimerização via técnica ATRP. Adaptado de: MESSIANA *et al.*, 2019.



Onde:

X: átomo de haleto (Br ou Cl)

Pn: Polímero;

[TM]: Metal de transição;

Ln: Ligante;

M: Monômero.

## 2.2. Parte Experimental

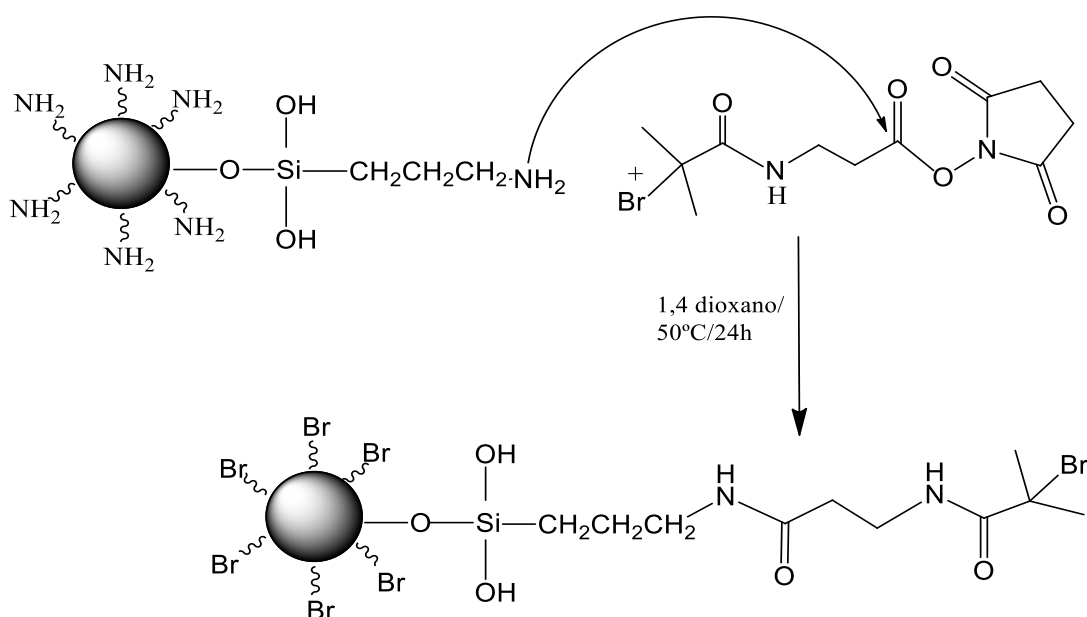
### 2.2.1. Síntese do material híbrido SBA-16-APTES-DOX@PVCL-co-PNIPAAm

Para este procedimento foram pesados 150 mg de APTES-SBA-16 contendo o fármaco doxorrubicina previamente incorporado (SBA-16-APTES-DOX), o qual foi colocado em um balão de fundo redondo. Posteriormente, foi adicionado sílica funcionalizada uma solução tampão carbonato/bicarbonato (0,927 g/0,105 g para 100 mL) e pH=9 (ProQuímios, PA, Rio de Janeiro-Brasil). A solução foi colocada em banho de silicone sob agitação constante de 150 rpm, em um aquecedor magnético na temperatura de 50 °C. A mistura foi deixada sob fluxo de N<sub>2</sub> durante 20 minutos para sua desoxigenação.

Em outro frasco, foram pesados 50 mg do iniciador (N-2-bromo-2-metilpropionil-B-N'-oxisuccinimida - NBS). Adicionou-se ao iniciador, 1,5 mL de 1,4-dioxano (99, 5 % v/v, Neon Química, São Paulo-Brasil). Esse sistema também foi deixado sob fluxo de N<sub>2</sub> durante 20 minutos para obtenção de atmosfera inerte.

A mistura contendo a dispersão de SBA-16-APTES-DOX foi adicionada à solução contendo o iniciador NBS utilizando uma seringa desoxigenada. Esse sistema foi mantido em banho de silicone, sob agitação, em uma chapa de aquecimento a 50 °C, 150 rpm, por 24 horas. Após esse período, o material obtido foi centrifugado e lavado com etanol (LS Chemicals, São Paulo-Brasil, 99,7%) e posteriormente, seco em estufa à vacuo na temperatura de 60 °C por 12 horas. Na **Figura 22** está apresentado o esquema reacional simplificado para a obtenção do macroiniciador SBA-16-APTES-DOX-Br.

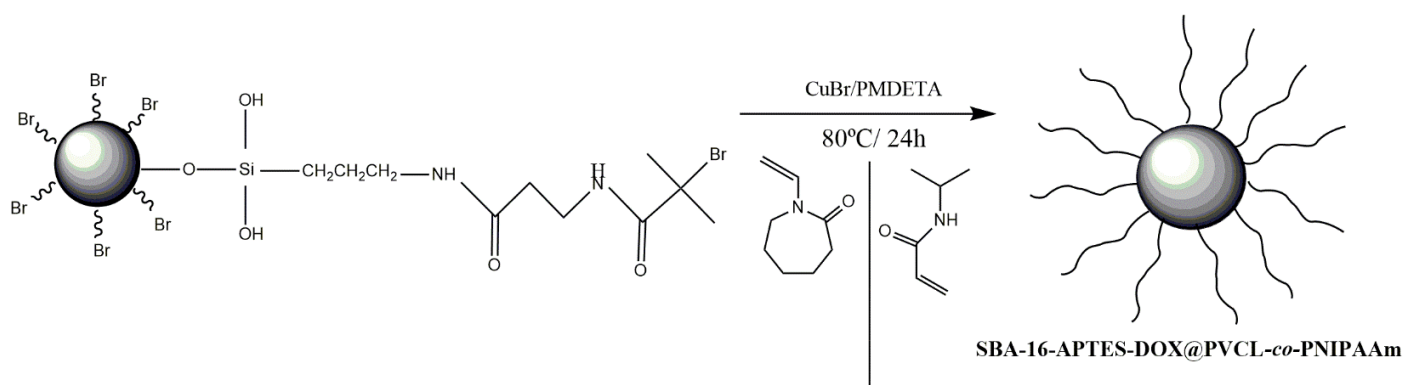
Figura 22: Ilustração esquemática da reação de obtenção do macroiniciador SBA-16-APTES-DOX-Br



Para a realização da polimerização via ATRP, o macroiniciador obtido na etapa anterior, SBA-16-APTES-DOX-Br, foi pesado e colocado em um balão de fundo redondo (**Figura 23**). Para 20 mg de macroiniciador utilizou-se, aproximadamente, 5 mg do sal de brometo de cobre (99,9%, Sigma Aldrich, Germany). Ao balão, juntamente com o macroiniciador e o CuBr, adicionou-se 4 mL de isopropanol:dioxano (1:1) (Isopropanol: Labsinth, São Paulo-Brasil, 99,5 % / Dioxano: 99,5 % v/v, Neon Química, São Paulo-Brasil). Essa mistura foi desoxigenada com fluxo de N<sub>2</sub> por 20 minutos. Esse foi considerado como "sistema 1". Em um outro balão, adicionou-se 0,19 g de cada um dos monômeros VCL e NIPAAm com 4 mL da solução isopropanol:dioxano (1:1). Essa solução também foi desoxigenada por 20 minutos. Esse foi considerado como "sistema 2". Posteriormente, o sistema 2 foi vertido rapidamente no sistema 1 e por fim, adicionou-se 25 µL do ligante pentametildietileno-triamina (PMDETA) (99 %, Sigma Aldrich, Germany) ao novo sistema, o qual foi novamente desoxigenado através da passagem de N<sub>2</sub> por 20 minutos..

O sistema final foi deixado em agitação magnética sob uma chapa de aquecimento, a 80 °C e 240 rpm por 24 horas. O material obtido, SBA-16-APTES-DOX@PVCL-*co*-PNIPAAm foi filtrado, precipitado em éter e lavado com metanol (Alphatec, São Paulo-Brasil, 99,8 %). Por fim, a amostra foi seca em uma estufa à vácuo na temperatura de 50 °C por 12 horas. As amostras obtidas em cada etapa foram posteriormente caracterizadas física e quimicamente.

Figura 23: Ilustração esquemática da síntese de nanopartículas híbridas de sílica revestidas de poli [(Vinilcaprolactama) -*co*- (N-isopropilacrilamida)], SBA-16-APTES-DOX@PVCL-*co*-PNIPAAm, via técnica ATRP.



Com base no trabalho realizado por Du *et al.* (2015), neste trabalho foram realizados diferentes ensaios para a síntese via ATRP variando alguns parâmetros conforme mostrado na Tabela 3. Foram alterados os parâmetros: massa do catalisador, volume do solvente e tempo reacional, objetivando obter as características ótimas para o material polimérico desejado.

Tabela 3 – Valores dos parâmetros utilizados nas sínteses via ATRP

Síntese	Iniciador (mg)	Catalisador (mg)	Ligante (μL)	VCL/NIPAAm (g)	Solvente total (mL)	Tempo (h)
1	20	13	25	0,19/0,19	2	24
2	20	5	25	0,19/0,19	2	24
3	20	5	25	0,19/0,19	2	6
4	20	5	25	0,19/0,19	4	24

## 2.2.2. Caracterização física e química do material híbrido

### 2.2.2.1 Caracterização física

A técnica de espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) foi empregada em amostras SBA-16-APTES-DOX@PVCL-*co*-PNIPAAm, seguindo os mesmos parâmetros citados no tópico 1.3.2.2.

### 2.2.2.2. Caracterização química

A espectroscopia na região do infravermelho foi usada para caracterizar qualitativamente as bandas características dos materiais SBA-16-APTES-DOX-Br e SBA-16-APTES-DOX@PVCL-co-PNIPAAm. O teste foi realizado seguindo os mesmos parâmetros citados no tópico **1.3.2.1**.

## 2.3. Resultados e Discussão

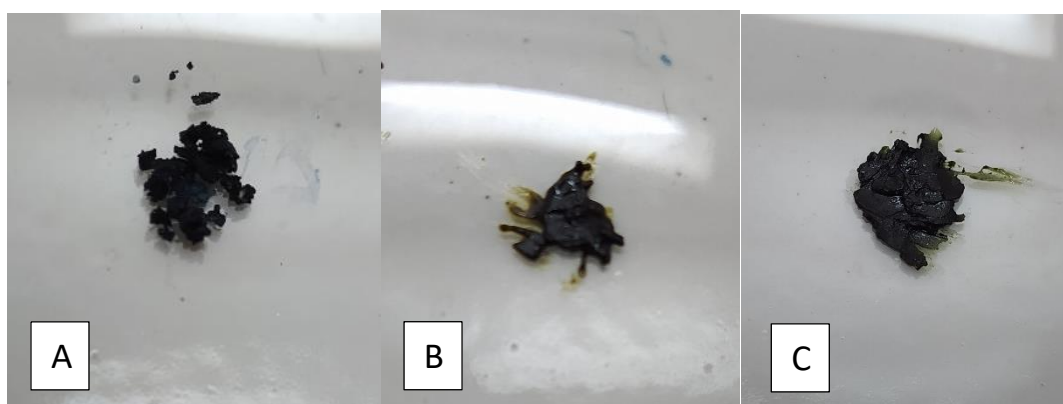
### 2.3.1 Caracterizações físicas

Foram empregadas diferentes rotas sintéticas via ATRP, nas quais alguns parâmetros foram alterados para a otimização da síntese e obtenção do material híbrido com as características de interesse. Na rota de síntese 1, em que se utilizou 2 mL de solvente no total e 13 mg de catalisador, os resultados revelaram que um material com aspecto de pasta, muito aderente foi obtido, indicando que provavelmente a polimerização ocorreu com alto grau de conversão, devido a maior quantidade de catalisador utilizado. O material também apresentou uma coloração azul escura que pode ser atribuída a presença de cobre que, durante a reação química descrita, provavelmente sofreu oxidação. Por se tratar de catalisador metálico e, geralmente com alto grau de toxidez, em formulações finais, se faz necessário a remoção total desses resíduos, em especial para aplicações biomédicas. Para a purificação do produto final, o mesmo foi lavado exaustivamente com etanol absoluto, porém, como o catalisador encontrava-se aparentemente muito aglomerado, essa etapa não apresentou a eficácia esperada, e portanto, não sendo possível a remoção total dos resíduos catalíticos de Cu. (**Figura 24A**).

Na rota de síntese 2, com o objetivo de se obter um melhor aspecto do material, utilizou-se apenas 5 mg de CuBr e os mesmos 2 mL de solvente no total. O resultado dessa síntese foi um produto com um aspecto mais pastoso que o anterior e com uma coloração mais esverdeada. Apesar da mudança de coloração, que indicava menos acúmulo de cobre oxidado, a textura se manteve parecida com a anterior, indicando que provavelmente o processo de polimerização também ocorreu com alto grau de conversão devido ao meio pouco diluído e o longo tempo de reação (**Figura 24B**).

Na terceira rota de síntese, conservou-se as quantidades de catalisador e solvente, porém a reação foi processada durante reduzido de 6 h. Finalizado o processo, o material obtido ainda apresentava o aspecto de pasta e a coloração verde bem escura. Nesse caso, foi possível concluir que nesse meio mais concentrado, o tempo reacional de 6 h foi suficiente para a polimerização. No entanto, o aspecto do material obtido era de difícil purificação devido a aglomeração e/ou complexação dos resíduos catalíticos com o polímero (**Figura 24C**).

Figura 24 – Em (A) (B) e (C) amostras do material híbrido obtido via ATRP, pelas sínteses 1, 2 e 3 respectivamente (**Tabela 3**) após lavagem com etanol.



Por fim, na quarta rota de síntese, trabalhando com a mesma quantidade de CuBr, porém, em um meio mais diluído (4 mL no total) e deixando o sistema por 24 h, foi possível obter um material com aspecto de pó e coloração bege escuro após a lavagem com etanol (**Figura 25A**). Desse modo, este material apresentou um melhor aspecto e facilidade de purificação, o qual foi utilizado para as análises posteriores. Para a remoção de resíduos de cobre da amostra, utilizou-se metanol (Alphatec, São Paulo-Brasil, 99,8 %), que mostrou ser um solvente mais potente para a remoção do cobre, deixando o material final com uma coloração mais clara (**Figura 25B**).

Figura 25 – Amostras do material híbrido obtido via ATRP pela rota de síntese 4 (**Tabela 3**) após lavagem com etanol(A) e metanol (B).

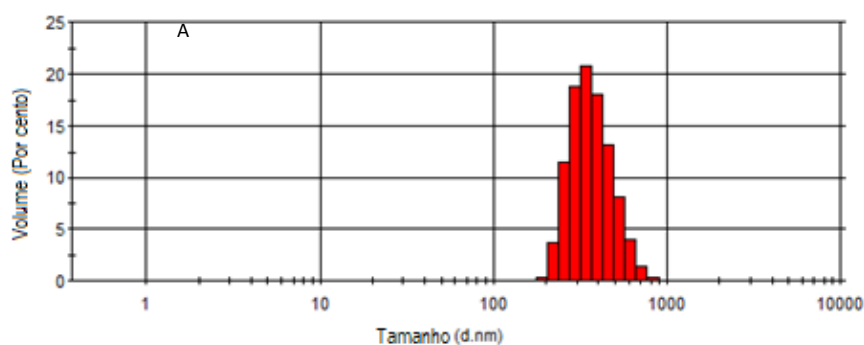


Os dois parâmetros que foram mais explorados durante as sínteses foram a quantidade de solvente e a concentração do catalisador. O solvente tem um efeito importante na estrutura e solubilidade e, portanto, na atividade do catalisador de ATRP. Além disso, solventes também são

importantes para aproximar todos os componentes da polimerização em uma única fase e influenciam diretamente na morfologia do polímero, além de governar a força das interações durante a polimerização. Sendo assim, possuem um forte efeito tanto na taxa de polimerização quanto no nível de controle da reação. O efeito do haleto de cobre é outro parâmetro importante que pode melhorar a controlabilidade de um processo ATRP. O catalisador é o responsável por intermediar o processo redox reversível de transferência de halogênio, gerando os radicais, o qual é determinante na constante de equilíbrio de transferência do átomo e a dinâmica de troca entre as espécies dormentes e ativas. Portanto, é esse processo que fornece o controle da polimerização e pode afetar na forma como as cadeias poliméricas crescem, ou seja, de modo controlado ou não. Porém, é importante considerar que a quantidade de catalisador utilizada deve ser bem equilibrada, de modo que o mesmo esteja em concentrações adequadas para realizar seu papel e ao mesmo tempo possa ser removido ao final do processo, devido a sua toxicidade (PARÍS, 2005; CHEN, 2018; TOLSTYKA, 2012).

Os resultados das análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para o material híbrido estão disponíveis na **Figura 26** e os dados revelam um diâmetro hidrodinâmico médio de  $447,5 \text{ nm} \pm 34 \text{ nm}$ . O índice de polidispersividade encontrado foi igual a 0,223 revelando o caráter monodisperso da amostra.

Figura 26: Análise de DLS de amostras constituída por SBA-16-APTES-DOXO@PVCL-co-PNIPAAm. (A) Distribuição do tamanho médio das partículas.



Comparando-se os resultados obtidos nas análises de DLS das amostras de APTES e o material híbrido nanoestruturado, é possível afirmar que o processo de polimerização contribuiu para um aumento significativo do diâmetro hidrodinâmico médio, sendo que as amostras híbridas são cerca de 23 % maiores que a matriz de sílica. Esse mesmo comportamento, de aumento das nanopartículas após a graftização polimérica, foi observado por Du *et al.* (2015) que atribuiu tal comportamento à presença das cadeias poliméricas, que foram covalentemente ligadas a matriz silanizada. Apesar do incremento



significativo no diâmetro hidrodinâmico médio observado no material híbrido, o mesmo ainda se encontra na faixa considerada ideal para a aplicação desejada, ou seja, como um veículo de transporte de fármacos direcionados em sítios tumorais, visto que está dentro da faixa para realizar o efeito de permeabilidade e retenção aumentado (EPR). Este efeito ocorre devido ao resultado do rápido crescimento do tumor e formação simultânea de novos vasos sanguíneos, que possuem um epitélio com vazamento e uma microvasculatura descontínua. As nanopartículas de 50 a 800 nm, são capazes de atravessar a parede dos vasos de regiões sadias do organismo (o espaço entre essas células é de apenas 15 a 30 nm), ao contrário do que acontece em regiões inflamadas ou mesmo aquelas onde estão os tumores. (VIEIRA, 2016). O valor do PDI encontrado foi levemente maior que o da sílica funcionalizada, sendo ainda abaixo de 0,3, e assim, ainda podendo ser considerado, um sistema monodisperso que tem potencial para aplicações biomédicas. Formulações bem-sucedidas de nanocarreadores seguros, estáveis e eficientes devem ser homogêneas (monodispersas), já que amostras polidispersas permitem a formação de coágulos e trombos em aplicações *in vivo* (DANAIEI *et al.*, 2018).

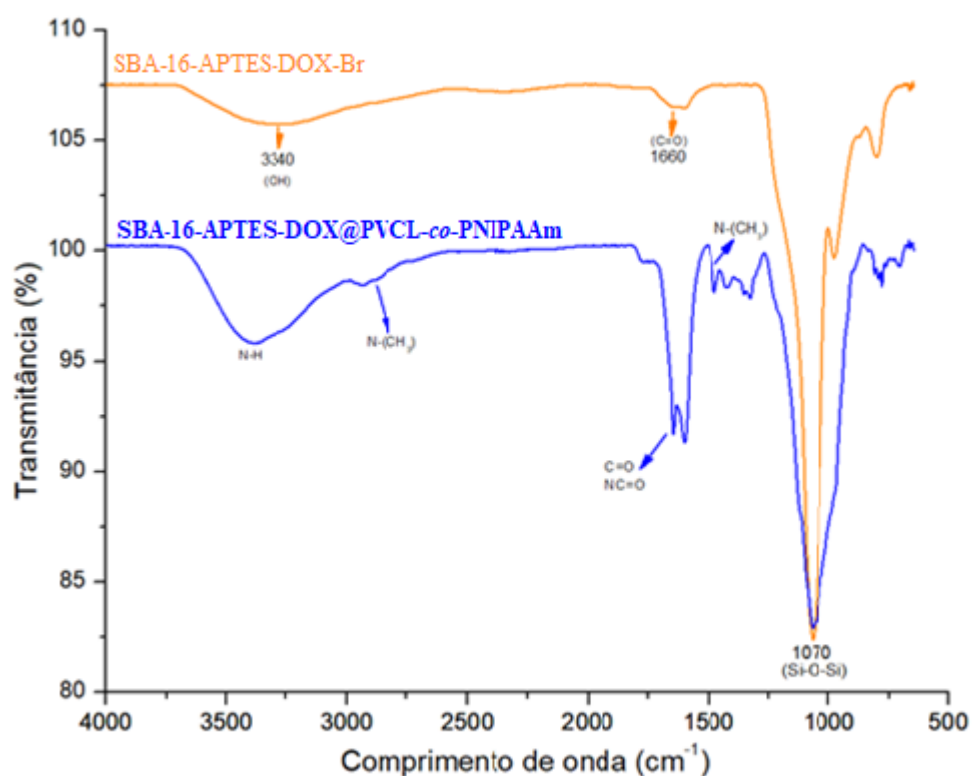
### 2.3.2. Caracterização química

Após a obtenção do SBA-16 funcionalizado com APTES, realizou-se o procedimento para a incorporação do fármaco onde amostras de nanopartículas silanizadas contendo DOXO foram obtidas (SBA-16-APTES-DOX). Este material serviu como substrato para as reações de polimerização. Para este procedimento, inicialmente foi necessário a preparação de um iniciador bromado. Este agente iniciador reagiu com as amostras de SBA-16-APTES-DOX até a obtenção de um macroiniciador (SBA-16-APTES-DOX-Br) o qual foi usado como iniciador no processo de polimerização dos monômeros VCL e NIPAAm. O processo de polimerização foi conduzido seguindo a rota de síntese 4 (**Tabela 3**), onde as amostras SBA-16-APTES-DOX@PVCL-*co*-PNIPAAm foram obtidas.

Os espectros de FTIR do macroiniciador, bem como do material híbrido obtido estão apresentados na **Figura 27** e os resultados obtidos revelaram significativas diferenças entre os espectros na região do infravermelho obtidos. No FTIR do macroiniciador, o aparecimento de uma banda vibracional discreta em  $1660\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento simétrico de uma carbonila (C=O) que, provavelmente, pertence ao grupamento amida do iniciador utilizado. Já no espectro de FTIR do polímero é possível identificar uma banda entre  $3500 - 3070\text{ cm}^{-1}$  larga e intensa que foi atribuída ao estiramento da ligação N-H, o que possivelmente é uma banda que corresponde a amida secundária do polímero PNIPAAm. Em aproximadamente  $1500\text{ cm}^{-1}$ , está presente uma banda discreta e estreita que foi atribuída a estiramento simétrico de ligações N-H em amidas secundárias, uma característica também do PNIPAAm (JADHAV *et al.*, 2016). Entre  $1700-1630\text{ cm}^{-1}$ , observa-se

duas bandas estreitas de intensidade média que quase se sobrepõem, que foram atribuídas ao estiramentos simétrico do grupo carbonila (C=O) que pode ser tanto de amidas secundárias presentes no PNIPAAm quanto da deformação axial da carbonila da caprolactama do PVCL.

Figura 27: Espectros FTIR das amostras do macroiniciador bromado e do copolímero graftizado ao material mesoporoso contendo fármaco incorporado (híbrido)



PAN *et al.* (2001) obtiveram espectros semelhantes para o PNIPAAm, encontrando bandas em 1538 cm<sup>-1</sup> e entre 3070-3301 cm<sup>-1</sup> (estiramento de ligações N-H de amidas secundárias), bem como uma banda em 1645 cm<sup>-1</sup> proveniente da carbonila de amidas secundárias. Da mesma forma, SOUSA (2009) também encontrou bandas de estiramento simétrico N-H de grupos carbonila de amidas secundárias em torno de 1648 e 1550 cm<sup>-1</sup> e bandas de estiramento de N-H de amidas secundárias na região de 3170-3370 cm<sup>-1</sup>. SOUZA (2016) analisou espectros do PVCL e observou uma banda larga em 3450 cm<sup>-1</sup>, característica de grupos OH e outra em 1640 cm<sup>-1</sup>, referente a carbonila do anel caprolactama. Usanmaz *et al.* (2009) também trabalharam com o PVCL e observaram a banda correspondente a ligação C=O em 1630 cm<sup>-1</sup>. Na região entre 1750-1250 cm<sup>-1</sup> o espectro gerado se assemelha muito com o espectro obtido neste presente trabalho. Os autores atribuíram as bandas nessa

região aos picos de C=O deslocados, picos de CH<sub>2</sub> e C-N. Considerando a semelhança dos espectros obtidos na literatura, é possível inferir que a presença dessas bandas características sugerem que o híbrido SBA-16-APTES-DOXO@PVCL-co-PNIPAAm foi preparado com sucesso.

## DISCUSSÃO GERAL

A partir das metodologias descritas foi possível obter a matriz SBA-16 que foi superficialmente modificada com sucesso com o 3-Aminopropil-trietoxissilano (APTES). Ambas matrizes foram caracterizadas em termos químicos, físicos e morfológicos. As caracterizações químicas serviram para identificar grupos químicos típicos do SBA-16, bem como identificar sua estrutura cristalina. Tais caracterizações também foram úteis para evidenciar o processo de funcionalização do SBA-16 com APTES. As análises termogravimétricas contribuíram para confirmar a modificação do SBA-16 após a silanização através da diferença de perda de massa durante o aquecimento. As caracterizações via DLS confirmaram que as nanopartículas obtidas são monodispersas, e que houve uma redução significativa da área do material funcionalizado, porém, apesar dessa redução, ambas as matrizes apresentaram áreas superficiais compatíveis com a incorporação de fármacos. Além disso, o tamanho médio obtido para ambas matrizes pode ser considerado adequado para aplicações biomédicas, pois está dentro da faixa que facilita a endocitose por células vivas. As análises de incorporação do fármaco revelaram que tanto no SBA-16 como no SBA-16 funcionalizado com APTES foi possível obter boas taxas de incorporação do fármaco Doxorrubicina. Para o SBA-16, a proporção ótima fármaco/nanopartícula encontrada foi de 100 µg/mL de fármaco para 20 mg/mL de sílica, que possibilitou uma taxa de incorporação de cerca de 87 %. Essa elevada taxa se explica devido à extensa área superficial do material e boa interação dos grupos silanois com a DOXO. Já na sílica funcionalizada com APTES, a proporção ótima fármaco/nanopartícula encontrada foi de 100 µg/mL de fármaco para 10 mg/mL de APTES-SBA1-6, possibilitando uma taxa de incorporação de cerca de 29 %, uma taxa menor quando comparada com o material não silanizado. Tal resultado pode ser explicado devido a menor interação DOXO-APTES, além de a menor área do material funcionalizado proporcionar menor incorporação de moléculas em seus poros. Porém, apesar do material funcionalizado incorporar menos fármaco, ele ainda incorpora quantidades satisfatórias do mesmo, comparando-se com outros resultados encontrados na literatura. Assim, pode-se considerar este resultado positivo, uma vez que o material funcionalizado é essencial para a obtenção do material híbrido de interesse. Ao se funcionalizar o SBA-16, grupamentos amina ficaram disponíveis na superfície do material e serviram como locais ativos por possuírem pares de elétrons disponíveis para interagir com o iniciador bromado, tornando possível a obtenção do macroiniciador utilizado da técnica ATRP, a qual se mostrou eficaz para a obtenção do material híbrido. Diversas rotas de síntese ATRP foram testadas e a que se mostrou mais promissora foi a realizada em 24 h, utilizando 20 mg de iniciador, 5 mg de catalisador, 25 µL de ligante, 4 mL de solvente e 0,19 g de cada um dos monômeros VCL/NIPAAm, sendo o metanol o solvente mais eficiente na remoção do cobre residual. A estrutura química do material híbrido foi comprovada através das análises de FTIR, com as quais foi possível

identificar grupamentos químicos típicos dos polímeros gerados. As análises de DLS revelaram que o material é monodisperso e têm tamanho ideal para realizar vetorização através do EPR.

## CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho possibilitou a preparação de um sistema híbrido orgânico-inorgânico. Tal sistema foi baseado em nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-16 funcionalizadas com APTES, contendo o fármaco doxorrubicina incorporado em quantidades satisfatórias, e recobertas com o copolímero termossensível PVCL-*co*-PNIPAAm. Esse material híbrido é um sistema inédito, que poderá servir como um potencial sistema terapêutico contra o câncer uma vez que, pode sofrer transição de fase a uma determinada temperatura que é adequada no tratamento da doença. Esse híbrido pode ainda permitir que a liberação do fármaco, incorporado na matriz de sílica funcionalizada, seja feita por meio da aplicação de um laser ou outro tipo de aquecimento. Dessa forma, como o fármaco pode ser entregue de forma mais seletiva no local apropriado, menos efeitos adversos serão observados nos pacientes tratados, e assim, pode-se promover um tratamento do câncer que seja mais humanizado.

## PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade de estudos pode-se citar:

- 1- A quantificação do grau de funcionalização das nanopartículas de sílica a partir da caracterização por análise elementar.
- 2- Caracterizar termicamente o material híbrido obtido, utilizando análise de calorimetria de varredura diferencial para estudar as transições de fases inerentes ao copolímero imobilizado nas superfícies das amostras de sílica.
- 3- Caracterizar fisicamente o material híbrido obtido, utilizando Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido (RMN), para a determinação da real presença dos devidos componentes químicos dos polímeros nas matrizes de sílica.
- 4- A Condução de ensaios *in vitro* envolvendo culturas de células tumorais e normais objetivando avaliar a citotoxicidade do sistema sob diferentes faixas de pHs.
- 5- A realização de estudos *in vivo*, poderá revelar dados sobre a toxicidade do sistema e bem como permitir estudos de biodistribuição que visem mostrar a acumulação tumoral

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIROLDI, C.; OLIVEIRA, V. Hydrophobic contribution to amoxicillin release associated with organofunctionalized mesoporous SBA-16 carriers. *Materials Research Bulletin*, v. 59, p. 214-222, nov. 2014.
- ALSEHLI, M. (2020). *Polymeric nanocarriers as stimuli-responsive systems for targeted tumor (cancer) therapy: Recent advances in drug delivery*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi: 10.1016/j.jsps.2020.01.004
- ANDRADE, G. F. *et al.* Mesoporous silica SBA-16/hydroxyapatite-based composite for ciprofloxacin delivery to bacterial bone infection. *J Sol-Gel Sci Technol*, 6 jul. 2017.
- ANDRADE, G. F. *et al.* **Funcionalização de sílica mesoporosa para aplicação em sistemas de fármacos controlada**. Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, 2011. Tese de Mestrado em Materiais, Belo Horizonte, 2016.
- ANDRADE, G. F. *et al.* Mesoporous silica SBA-16 nanoparticles: Synthesis, physicochemical characterization, release profile, and in vitro cytocompatibility studies. *Microporous and Mesoporous Materials*, [S. l.], p. 102–110, 29 set. 2013.
- AVERICK, S. *et al.*, **ATRP under biologically relevant conditions: grafting from a protein**, *ACS. Macro. Lett.* 1 (2012) 6–10, <https://doi.org/10.1021/mz200020c>.
- BALLEM, M. A, CÓRDOBA, J.M, ODÉN, M. Influence of synthesis temperature on morphology of SBA-16 mesoporous materials with a three-dimensional pore system: *Microporous and Mesoporous Materials*. 2010; 129 (2): 106-111.
- BANGHAM, A. D. *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1965, 13, 238–52.
- BERKTAS, I., GHAFAR, A. N., FONTANA, P., CAPUTCU, A., MENCELOGLU, Y., & OKAN, B. S. (2020). *Facile Synthesis of Graphene from Waste Tire/Silica Hybrid Additives and Optimization Study for the Fabrication of Thermally Enhanced Cement Grouts*. *Molecules*, 25(4), 886. doi:10.3390/molecules25040886
- BISSADI, G., & WEBERSKIRCH, R. (2016). *Efficient synthesis of polyoxazoline-silica hybrid nanoparticles by using the “grafting-onto” approach*. *Polymer Chemistry*, 7(6), 1271–1280. doi:10.1039/c5py01775k
- BRAY, F.B. *et al.* Wiley Online Library, 2018. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21492>>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- BRITO, de H. G.; VALE, J. R. L. Do, INCORPORAÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS EM MATRIZES DE SÍLICA MESOPOROSA DO TIPO SBA-15: INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES

DE SÍNTESE E APLICAÇÃO. I Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química/CCEN (2015)

CAIXETA, A. V. *et al.* **Nanomedicamentos e Nanocarreadores de drogas para o uso terapêutico de Câncer**. 8ª Mostra De Produção Científica Da Pós-Graduação Latu Sensu Da PUC Goiás, 2013. Disponível em: < <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/8mostra/Artigos.html>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

CANDIDO, C. D. **Avaliação de Distribuição de doxorubicina incorporada em microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em Camundongos**. 2013. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”, Araraquara, 2013.

CHEN, M., *et al.* Controllable preparation of polymer brushes from mesoporous silica SBA-15 via surface-initiated ARGET ATRP, *Microporous and Mesoporous Materials* (2018), doi: 10.1016/j.micromeso.2017.12.019.

COUTINHO, E. C. **Nanopartículas de sílica mesoporosas**. 2014.

DAEIHAMED, M.; HAERI. A.; DADASHZADEH S. A Simple and Sensitive HPLC Method for Fluorescence Quantitation of Doxorubicin in Micro-volume Plasma: Applications to Pharmacokinetic Studies in Rats. *Iran J Pharm Res*. 2015 Winter;14(Suppl):33-42. PMID: 26185503; PMCID: PMC4499424.

DANAEI M, DEGHANKHOLD M, ATAEI S, *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57. Published 2018 May 18. doi:10.3390/pharmaceutics10020057

DOADRIO, J. C. *et al.* Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern. **Journal of Materials Chemistry**, p. 462–467, 2006.

DU, Z., SUN, X., TAI, X., WANG, G., & LIU, X. (2015). *Synthesis of hybrid silica nanoparticles grafted with thermoresponsive poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate via AGET-ATRP*. *RSC Advances*, 5(22), 17194–17201. doi:10.1039/c4ra17013j

FELIX, J.E.M. *et al.* **SÍNTESE DE SILICA MESOPOROSA SBA-16, DE ALTA ÁREA SUPERFICIAL E COM ALTO RENDIMENTO PARA ADSORÇÃO DE METAIS**. 2012.

FREITAS, L. B. D. O.; BRAVO, I. J. G.; MACEDO W. A. D. A.; DE SOUSA E. M. B. (2016). *Mesoporous silica materials functionalized with folic acid: preparation, characterization and release profile study with methotrexate*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 77(1), 186–204. doi:10.1007/s10971-015-3844-8

GOBIN, O. C. SBA – 16: **Synthesis, diffusion and sorption properties**. Quebec: Laval University, 2006. Quimioterapia. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 26 mar. 2018.

GOSCIANSK, J. *et al.* APTES-functionalized mesoporous silica as a vehicle for antipyrine – adsorption and release studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 12 jul. 2017.

GONÇALVES, M. C. **Estudo Experimental da Polimerização via Radical Livre Controlada em Presença de Radicais Nitróxido (NMRP)**. 2006. 128 p. Dissertação (Mestrado- Engenharia Química) - Universidade Estadual De Campinas, Campinas - SP, 2006.

GURNANI, P.; PERRIER, S. (2020). **Controlled radical polymerization in dispersed systems for biological applications.** *Progress in Polymer Science*, 101209. doi:10.1016/j.progpolymsci.2020.101209.

GUZIK, A. F. *et al.* Synthesis and characterization of SBA-16 type mesoporous materials containing amine groups. **Microporous and Mesoporous Materials**, 231-238, set. 2016.

HESS, B. S. Desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para determinação simultânea de captopril, hidroclorotiazida e seus compostos relacionados e avaliação da equivalência farmacêutica de medicamentos anti-hipertensivos. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Paraná. Curitiba , 2011.

HOWARTER, J. A; YOUNGLOOD, J. P. **Optimization of sílica silanization by 3 – aminopropyltriethosilane**. Indiana: Escola de Engenharia de Materiais. Universidade Purdue, 2006.

HÜBNER, E., ALLGAIER, J., MEYER, M., STELLBRINK, J., PYCKHOUT-HINTZEN, W., & RICHTER, D. (2010). *Synthesis of Polymer/Silica Hybrid Nanoparticles Using Anionic Polymerization Techniques. Macromolecules*, 43(2), 856–867. doi:10.1021/ma902213p

ICHINOSE, L. D. S. Desenvolvimento e validação de método analítico de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para basilato de anlodipino e seus produtos de degração. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 126. 2017.

INCA. **Estatísticas de câncer**. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

INCA. **O que é câncer?** 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

JADHAV, S. A. *et al.* Thermoresponsive copolymer-grafted SBA-15 porous silica particles for temperature-triggered topical delivery systems. **EXPRESS Polymer Letters**, v. 11, n. 2, p. 96-105, 23 set. 2016.

JOURSHABANI, M. *et al.* Application of Response Surface Methodology as an Efficient Approach for Optimization of Operational Variables in Benzene Hydroxylation to Phenol by V/SBA-16 Nanoporous Catalyst. **J. Nanostruct**, v. 6, n. 2, p. 105-113.2016.

KNOFEL, C. *et al.*; Functionalised micro-/mesoporous sílica for the adsorption of carbono dioxide. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 99, n. 1-2, p. 79-85, 2007.



KWON, S.; SINGH, R. K.; PEREZ, R. A.; ABOU NEEL, E. A.; KIM, H.-W.; CHRZANOWSKI, W. (2013). *Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery*. *Journal of Tissue Engineering*, 4(0), 4/0/2041731413503357-. doi:10.1177/2041731413503357

LAGARRIGUE, P.; SOULIÉ, J.; GROSSIN, D.; DUPRET-BORIES, A.; COMBES, C.; DARCOS, V. (2020). *Well-defined polyester-grafted silica nanoparticles for biomedical applications: Synthesis and quantitative characterization*. *Polymer*, (), 123048-. doi:10.1016/j.polymer.2020.123048

LAVAN, D.A. *et al.* *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, 1184–1191.

LANGER, R. *Science* (80-.), 1990, 249, 1527–1533.

LIECHTY, W. *et al.* *Polymers for Drug Delivery Systems*. **Annu Rev Chem Biomol Eng**, [S. l.], p. 149–173, 11 set. 2012

LOPES, T. R. Utilização de RMN no estado sólido em uma abordagem multinuclear para estudo de materiais carbonosos porosos. Tese de Doutorado em Física - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2017.

MA, LIANG; LI, NA; ZHU, JIAN; CHEN, XIAODONG (2017). *Visible Light-Induced Metal Free Surface Initiated Atom Transfer Radical Polymerization of Methyl Methacrylate on SBA-15*. *Polymers*, 9(12), 58-. doi:10.3390/polym9020058

MALVIYA, R. *et al.* HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: A SHORT REVIEW. **Journal of Global Pharma Technology**, p. 22-26, jun. 2010.

MESQUITA, M. L. de. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica**. 2009.

MESSINA, M. S.; BHATTACHARYA, A., MONTGOMERY, H. R., & MAYNARD, H. D. (2019). **Preparation of Biomolecule-Polymer Conjugates by Grafting-From Using ATRP, RAFT, or ROMP**. *Progress in Polymer Science*, 101186. doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.101186.

MURARO, P. I. R. **Polímeros Fluorados Anfílicos para Aplicação em Diagnósticos por Imagens de Ressonância Magnética**. 2014. 181 p. Tese (Doutorado - Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2014.

NAGHILOO, M. *et al.* Functionalization of SBA-16 silica particles for ibuprofen delivery. **J Sol-Gel Sci Technol**, [S. l.], p. 0-1, 14 jan. 2015.

ODIAN, G. Principles of polymerization. 4ª Edição. John Wiley & Sons - United States of America. ISBN: 978-0-471-27400-1. Fevereiro, 2004.

PAN, Y. V. *et al.* Plasma Polymerized N-Isopropylacrylamide: Synthesis and Characterization of a Smart Thermally Responsive Coating. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 32-36, 1 jan. 2001.

PARÍS, R., & DE LA FUENTE, J. L. (2005). *Solvent effect on the atom transfer radical*

*polymerization of allyl methacrylate. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43(24), 6247–6261. doi:10.1002/pola.21111.

PATRA, J.K., DAS, G., FRACETO, L.F. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol* **16**, 71 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

PELEGRI-O'DAY, E. M., LIN, E.-W., & MAYNARD, H. D. (2014). *Therapeutic Protein–Polymer Conjugates: Advancing Beyond PEGylation. Journal of the American Chemical Society*, 136(41), 14323–14332. doi:10.1021/ja504390x

QUEIROZ, M. M. F. Utilização da técnica hifenada CLAE-DAD-IES-EM na detecção e caracterização de substâncias em *Ocotea paranapiacabensis* e *Aniba firmula* (Lauraceae). Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista. Araraquara, p. 135. 2009.

RIBEIRO, J. de O. N.; *et al.* (2019). Role of the type of grafting solvent and its removal process on APTES functionalization onto SBA-15 silica for CO<sub>2</sub> adsorption. *Journal of Porous Materials*, (), – . doi:10.1007/s10934-019-00754-6

RIVANKAR, SANGEETA (2014). *An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(4), 853–. doi:10.4103/0973-1482.139267

ROSENHOLM, J. M. *et al.* **Nanopartículas na terapia dirigida ao câncer:** nanopartículas de sílica mesoporosa entrando no estágio de desenvolvimento pré - clínico. Página 111, 2012.

SILVA, P. D. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. Dissertação (Química Industrial) - UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR. Covilhã, 2012.

SOARES, D. C. F. *et al.* Mesoporous SBA-16 silica nanoparticles as a potential vaccine adjuvant against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microporous and Mesoporous Materials**, p. 1387-1811, jan. 2020.

SOUSA, A. de. **Híbridos de Gel Polimérico em Sílica Mesoporosa Estruturalmente Ordenada para Liberação Controlada de Fármacos.** 2009. Tese (Engenharia Química)- Universidade de Minas Gerais. 2009.

SOUZA, B. A. de C. **Síntese e Caracterização de copolímeros em blocos biocompatíveis do tipo poli(N-vinilcaprolactama)-b-poli(etilenoglicol) para encapsulação do cetoprofeno utilizando a técnica de secagem por atomização.** 2016. Tese (Engenharia Química) - Universidade Federal de São Paulo, 2016.

TANG, W.; MATYJASZEWSKI, K. (2006). *Effect of Ligand Structure on Activation Rate Constants in ATRP. Macromolecules*, 39(15), 4953–4959. doi:10.1021/ma0609634

THOMMES *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and

- pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051-1069.
- TONHI, E. *et al.* Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (Clae–Fr) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616-632, 2002.
- TOLSTYKA, Z.P. (2012). *Polymer Science: A Comprehensive Reference // Protein–Polymer Conjugates*. 317–337. doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00250-8
- TSANG, E.M.W. (2012). *Polymer Science: A Comprehensive Reference // Alternative Proton Exchange Membranes by Chain-Growth Polymerization*. 651–689. doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00285-5
- USANMAZ, A. *et al.* Solid State Polymerization of N-vinylcaprolactam via Gamma Irradiation and Characterization. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, p. 37-41, 23 dez. 2014.
- VIEIRA, D.B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **REVENDO CIÊNCIAS BÁSICAS**, p. 9-103, 1 jan. 2016.
- VIEIRA, V. B. C. **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA NA LIBERAÇÃO DO ANTICANCERÍGENO INDOL-3-CARBINOL**. Dissertação (Tecnologias em Saúde.) - Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, 2015.
- VILAS BOAS, R. R. Desenvolvimento e validação de método para a quantificação de vancomicina em soro por CLAE-DAD e elaboração de protocolo de monitorização terapêutica em uti neonatal. Dissertação - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.
- XING M, YAN F, YU S, SHEN P (2015) Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal DoxorubicinBased Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE* 10(7): e0133569. doi:10.1371/journal.pone.0133569
- ZHAO H., HAN H., Synthesis and characterization of functionalized SBA-15 silica through template removal, *Journal of Solid State Chemistry* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2019.121074>.
- ZHOU, Y. *et al.* **Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery**. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2018. WEISS, C. A. *et al.* *Microporous Mesoporous Mater.*, 2016, **227**, 242–251.
- ZORVARYAN, A.; NCEOGLU, S.; ACAR, M. H. (2011). *Alkylation of polyethyleneimine for homogeneous ligands in ATRP.* , 52(3), 617–621. doi:10.1016/j.polymer.2010.12.041
- WICK *et al.* Nanomedicine in câncer therapy: challenges opportunities, and clinical application. Páginas: 138 a 157, 2015.

YILDIZ, T. Doxorubicin-loaded protease-activated nearinfrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6961–6986, 11 jan. 2020.