



Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto-MG
Escola de Farmácia
Departamento de Farmácia



Sabrina Emanuelle Dias Silva

**DEGRADAÇÃO DE POLILACTÍDEO NANOESTRUTURADO EM MEIO
BIOLÓGICO**

Ouro Preto – MG

Junho 2019



Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto-MG
Escola de Farmácia
Departamento de Farmácia



Sabrina Emanuelle Dias Silva

DEGRADAÇÃO DE POLILACTÍDEO NANOESTRUTURADO EM MEIO BIOLÓGICO

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia no curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

Co -Orientadora: Dra. Gwenaelle Elza Nathalie Pound-Lana.

Ouro Preto – MG

Junho 2019

S586d Silva, Sabrina Emanuelle Dias.
Degradação de polilactideo nanoestruturado em meio biológico [manuscrito] /
Sabrina Emanuelle Dias Silva. - 2019.

47f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gwenaelle Elza Nathalie Pound-Lana.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Biopolímeros. 2. Degradação ambiental. 3. Poliésteres. I. Mosqueira,
Vanessa Carla Furtado . II. Pound-Lana, Gwenaelle Elza Nathalie. III.
Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.11

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 442ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 28 dias do mês de junho de dois mil e dezenove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 14 horas, no Auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia da candidata ao grau de Farmacêutico Generalista, **Sabrina Emanuelle Dias Silva**, matrícula 15.2.2057, intitulada **Degradação de polilactídeo nanoestruturado em meio biológico**. A Banca Examinadora foi constituída pela doutoranda Doutoranda Elisa Gomes Lanna, CIPHARMA/EF/UFOP, pela doutoranda Marina Guimarães Carvalho, CIPHARMA/EF/UFOP, e pela orientadora Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira, DEFAR/EF/UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 9,0. Comunicou-se a candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito da orientadora. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 28 de junho de 2019.

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
(orientadora)

Doutoranda Elisa Gomes Lanna

Doutoranda Marina Guimarães Carvalho

Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização de mais um sonho. Aos meus amigos, namorado e familiares, principalmente, meus pais por ter me dado todo o apoio necessário para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de conclusão de curso contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não teria se tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Universidade Federal de Ouro Preto e seu corpo docente que proporcionaram meu aprendizado.

Aos meus pais, Cecília e Reginaldo, pelo exemplo de vida e por todo apoio, em todas as minhas necessidades, sempre proporcionando todo amor e dedicação para que eu pudesse continuar esta jornada.

A minhas irmãs, Cynthia e Samanta, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas e pelo apoio e incentivo incondicional.

Ao meu namorado, Matheus, por todo amor, paciência e zelo; com seu apoio, sempre presente nos momentos mais difíceis. Obrigada por tornar mais leve essa caminhada!

Aos amigos, em especial Talita, Márcia, Paula, Rúbia, Thaís e Jéssica, que estiveram ao meu lado durante toda esta jornada, obrigada pelo companheirismo de sempre, força e apoio nos momentos mais difíceis. A amizade de vocês foi um presente que ganhei da vida e vou levá-la comigo para sempre.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Vanessa Carla Furtado Mosqueira, pela oportunidade e confiança de atuar como sua aluna de iniciação científica.

Um agradecimento especial a minha Co-orientadora Dra. Gwenaelle Pound-lana por todo conhecimento transmitido, pela confiança, amizade, conselhos e paciência durante toda essa jornada. Sem dúvida nenhuma você foi uma das pessoas que possibilitou meu crescimento tanto pessoal quanto profissional e esta experiência vou levar para a vida toda. Agradeço por tudo que fez por mim durante todo este tempo!

À toda equipe do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia pela convivência. Deixo aqui um agradecimento especial à Maria Alice por ser tão prestativa, paciente e sempre me ajudar, quando necessário, na realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas, lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

A utilização de poliésteres obtidos pela polimerização de α -hidroxi-ácidos e seus copolímeros em sistemas de liberação de fármacos vem crescendo expressivamente, visto que, tais polímeros são biocompatíveis e biodegradáveis. Dessa forma, este estudo avalia o uso da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) combinada à técnica de fracionamento de fluxo de campo de fluxo assimétrico com detectores de dispersão dinâmica e estática da luz (AF4-DLS-MALS) para determinar a cinética de degradação do polímero e fornecer informações mecanísticas sobre a degradação dos polímeros polietileno glicol (PEG) e polilactídeo (PLA) na forma nanoestruturada. Suspensões aquosas de nanoesferas foram obtidas pelo método de nanoprecipitação a partir de copolímeros dibloco de PEG e PLA, sendo usados dois tipos de PEG-*b*-PLA, ambos com bloco PLA de massa molar 20 kg/mol, porém com bloco PEG de massa molar 2 ou 5 kg/mol, avaliando-se assim a influência da massa molar do bloco de PEG na estabilidade coloidal das nanopartículas e degradação hidrolítica dos polímeros. As nanosuspensões foram mantidas a 37°C em água (pH 7), em meio ácido (pH 1) e em meio de cultivo de células suplementado com 10% de soro fetal bovino (DMEM/FBS). Amostras foram retiradas do meio de degradação ao longo do tempo para determinação da massa molar do polímero por GPC e análise quanto ao tamanho e morfologia das nanopartículas por AF4-DLS-MALS. Através das análises por GPC foi possível observar uma diminuição da massa molar do polímero em função do tempo de degradação, sendo que as amostras de nanoesferas provenientes do polímero PEG_{5k}PLA_{20k} apresentou uma degradação química das cadeias poliméricas mais acentuada que amostras de nanoesferas provenientes do polímero PEG_{2k}PLA_{20k}, em todos os meios de degradação. Por meio da técnica de AF4-DLS-MALS foi verificada a manutenção da estabilidade coloidal em água sem aumento de diâmetro e um ligeiro aumento na distribuição de tamanho da amostra no soro, apresentando nanopartículas maiores em relação à amostra inicial. A AF4-DLS-MALS combinada a GPC fornece dados adicionais no estudo da cinética e dos mecanismos de degradação do polímero, que são de grande valor, quando se trata da avaliação pré-clínica de nanocarreadores de fármacos poliméricos.

Palavras – chave: polímero biodegradável; degradação; meio biológico, poliésteres.

ABSTRACT

The use of polyesters obtained by the polymerization of α -hydroxy acids and their copolymers in drug delivery systems has been increasing significantly, since such polymers are biocompatible and biodegradable. Thus, this study evaluates the use of the gel permeation chromatography (GPC) technique combined with the asymmetric flow field fractionation technique with dynamic and static light scattering detectors (AF4-DLS-MALS) to determine the kinetics of polymer degradation and to provide mechanical information on the degradation of polymers polyethylene glycol (PEG) and polylactide (PLA) in the nanostructured form. Aqueous suspensions of nanospheres were obtained by the nanoprecipitation method from diblock copolymers of PEG and PLA, using two types of PEG-b-PLA, both with PLA block of molar mass 20 kg / mol, but with PEG block of molar mass 2 or 5 kg / mol, thus evaluating the influence of the molecular weight of the PEG block on the colloidal stability of the nanoparticles and the hydrolytic degradation of the polymers. The nanosuspensions were maintained at 37 ° C in water (pH 7), in acid medium (pH 1) and in cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (DMEM / FBS). Samples were taken from the degradation medium over time to determine the molar mass of the polymer by GPC and analysis for the size and morphology of the nanoparticles by AF4-DLS-MALS. Through the GPC analysis, it was possible to observe a decrease in the molar mass of the polymer as a function of the degradation time, and the nanosphere samples from the polymer PEG_{5k}PLA_{20k} presented a more pronounced chemical degradation of the polymer chains than samples of nanospheres from the polymer PEG_{2k}PLA_{20k}, in all means of degradation. The AF4-DLS-MALS technique allowed the maintenance of colloidal stability in water without increasing the diameter and a slight increase in the size distribution of the sample in the serum, presenting bigger nanoparticles in relation to the initial sample. AF4-DLS-MALS combined with GPC provides additional data in the study of polymer kinetics and degradation mechanisms, which are of great value when it comes to preclinical evaluation of polymer nanoreagents.

Keywords: biodegradable polymer; degradation; biological environment, polyesters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) e lipídicas (nanoemulsões e lipossomas)	18
Figura 2: Poli (ácido láctico).....	18
Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos de separação de moléculas por cromatografia de permeação em gel.	22
Figura 4: Representação esquemática dos mecanismos de separação de moléculas por fracionamento em campo de fluxo assimétrico	23
Figura 5: Representação esquemática de preparo de NS pelo método de nanoprecipitação ..	27
Figura 6: Curvas de calibração relacionando a área sob o pico do sinal de índice de refração nos cromatogramas de GPC à concentração do polímero na amostra.....	30
Figura 7: Cromatogramas do estudo de estabilidade na água pH 7, A (PEG _{5K} PLA _{20k}) e B (PEG _{2k} PLA _{20k}) dos polímeros na sua forma nanoestruturada.	32
Figura 8: Cromatogramas do estudo de estabilidade em HCl pH 1,0; C (PEG _{5K} PLA _{20k}) e D (PEG _{2k} PLA _{20k}) dos polímeros na sua forma nanoestruturada.	33
Figura 9: Estudo por cromatografia de permeação em gel da estabilidade em meio DMEM/FBS dos polímeros na sua forma nanoestruturada. As distribuições de massas molares (F e H) foram determinadas a partir dos cromatogramas (E e G, respectivamente) das amostras de NS-PEG _{5k} PLA _{20k} (acima) e NS-PEG _{2k} PLA _{20k} (abaixo).....	34
Figura 10: Aspecto das formulações de NS-PEG _{5K} PLA _{20K} (tubo à esquerda) e NS-PEG _{2K} PLA _{20K} (tubo à direita) em DMEM contendo FBS e avaliação do seu pH após 15 dias a 37 °C.....	35
Figura 11: Gráfico de análise das massas molares das formulações nos meios de incubação ao longo de todo estudo. (Ao final é representado o percentual de perda de massa molar de cada amostra em seu meio de incubação)	36

Figura 12: Análises por AF4 das nanoesferas de PEG _{5k} PLA _{20k} (A) e PEG _{2k} PLA _{20k} (B) nos diferentes meios de incubação durante 24h.....	38
Figura 13: Análises por AF4 das nanoesferas de PEG _{5k} PLA _{20k} (C) e PEG _{2k} PLA _{20k} (D) em meio aquoso.....	39
Figura 14: Análises por AF4 das nanoesferas de PEG _{5k} PLA _{20k} (E) e PEG _{2k} PLA _{20k} (F) em meio ácido.	40
Figura 15: Análise por AF4 em meio DMEM/FBS dos polímeros na sua forma nanoestruturada. PEG _{5k} PLA _{20k} (G) e PEG _{2k} PLA _{20k} (H).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Quantificação do polímero em amostras de NP por GPC.....	31
Tabela 02: Evolução dos tamanhos de partículas por AF4 - Estudo de degradação por AF4: raios das NP após incubação nos diversos meios. Determinação em nm do Rh por DLS e do Rg por MALLS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF4 – Fracionamento em campo de fluxo assimétrico

CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado

DLS – “*Dynamic Laser Light Scattering*” - Dispersão Dinâmica da Luz Laser

FBS – “*Fetal Bovine Serum*” - Soro bovino fetal

g – Aceleração da gravidade

GPC – Cromatografia de permeação em gel

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HCl – Ácido Clorídrico

MALLS – “*Multi Angle Laser Light Scattering*” - Dispersão estática da luz laser em multiângulos

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NP – Nanopartícula

NS – Nanoesfera

PEG – Polietileno glicol

PLA – Poli (ácido láctico)

PLA-PEG - Ácido Polilático-co-polietileno glicol

PLGA – poli(*D,L*-lactide-co-glicolide)

RI – índice de refração

SE – Solução estoque

THF – Tetraidrofurano

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Nanopartículas poliméricas	17
2.2 Degradação de nanopartículas de poliéster biodegradável.....	18
2.2.1 Influência do pH.....	19
2.2.2 Influência da Temperatura	19
2.3 Alterações ocasionadas pela degradação polimérica.....	20
2.3.1 Morfologia das nanopartículas	20
2.3.2 Tamanho de nanopartículas.....	20
2.4 Avaliação da degradação polimérica em nanopartículas.....	21
2.4.1 Caracterização por cromatografia por permeação em gel.....	21
2.4.2 Caracterização por fracionamento em campo de fluxo assimétrico acoplado a detectores de espalhamento dinâmico e estático da luz (AF4-DLS-MALS)	22
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo geral	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 MATERIAIS	26
5.2 MÉTODOS.....	26
5.2.1 Elaboração de uma curva de calibração por GPC	26
5.2.2 Preparo de nanoesferas (NS) pelo método de nanoprecipitação	27
5.2.3 Quantificação do polímero em amostras de NS por GPC.....	28
5.2.4 Estudo da degradação do polímero nanoestruturado.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1 Elaboração da curva de calibração por cromatografia por GPC	30

6.2	Quantificação do polímero em amostras de NP por GPC	31
6.3	Estudo da degradação do polímero por GPC.....	31
6.3.1	Degradação em meio aquoso	31
6.3.2	Degradação em meio ácido	32
6.3.2	Degradação em meio contendo DMEM/FBS.....	33
6.4	Degradação das NP por AF4-DLS-MALS	37
6.4.1	Degradação em meio aquoso	38
6.4.2	Degradação em meio ácido	39
6.3.2	Degradação em meio contendo DMEM/FBS.....	40
7.	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Nanocarreadores preparados à base de polímeros anfífilos derivados de poliésteres biodegradáveis são amplamente aplicados ao tratamento de diferentes doenças, numa área hoje denominada nanomedicina. Dessa forma, visando à translação desses nanoveículos para aplicações clínicas, a síntese de polímeros marcados com sondas fluorescentes (fluoróforos) possibilita estudos mais completos e precisos na área de nanotoxicidade (*in vitro*) e biodistribuição (*in vivo*) (POUND-LANA, 2017). Materiais na forma nanoestruturada apresentam propriedades físicas e químicas distintas dos materiais na escala macrométrica devido ao aumento da área interfacial em contato com o meio biológico (DISCHER, D. E.; EISENBERG, A., 2002).

Dentre os diversos tipos de polímeros utilizados no preparo de nanopartículas, o poli(ácido lático (PLA) e seus copolímeros, como ácido Polilático-co-poli(etileno glicol) (PLA-PEG) se destaca devido ao seu caráter biocompatível e biodegradável. E, devido a este caráter tanto biocompatível quanto biodegradável, o PLA já vem sendo utilizado há bastante tempo na produção de próteses e implantes, na engenharia de tecidos e no preparo de nanopartículas para entrega direcionada de fármacos (SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

No contexto da vetorização de fármacos, a interação do nanocarreador de alta área superficial com os componentes dos meios biológicos pode alterar o seu perfil de degradação e assim alterar o perfil de liberação de fármaco e suas propriedades farmacocinéticas. Embora as primeiras aplicações de nanocarreadores poliméricos necessitassem de administração por via endovenosa, estudos recentes demonstram a utilidade desses nanoveículos também por via oral (MELLO, C. et al, 2016). Porém, a estabilidade dos nanocarreadores e o mecanismo de liberação do fármaco nesses meios não estão totalmente esclarecidos, devido à complexidade desses sistemas e a dificuldade de determinar o destino do nanocarreador em conjunto ao do fármaco (AVGOUSTAKIS. K. et al, 2002).

Portanto, esse estudo visa à caracterização dos polímeros nanoestruturados em meios biológicos relevantes para a execução de análises *in vitro* e *in vivo*, determinando a sua estabilidade química e a estabilidade coloidal do nanocarreador. Esse estudo poderá contribuir para a definição de condições experimentais de estudos *in vitro* e poderá auxiliar no esclarecimento do destino desses nanoveículos, tanto pela via endovenosa quanto oral e assim nortear estudos em relação à via de administração *in vivo* e eventuais aplicações clínicas futuras.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanopartículas poliméricas

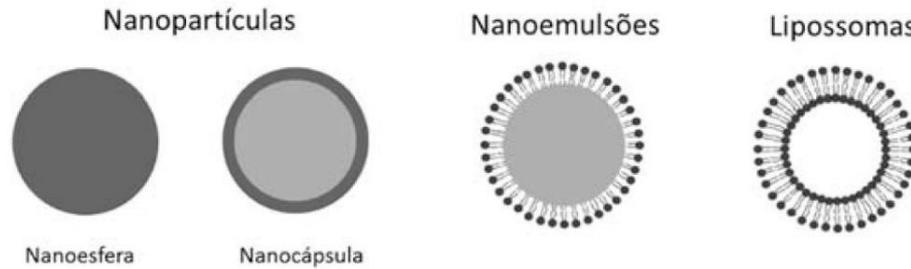
Nanocarreadores têm um potencial crescente de aplicações clínicas. A expectativa atual e futura de um nanocarreador é exibir funções diagnósticas e terapêuticas. Dessa forma, o desenvolvimento de nanocarreadores de nova geração para alcançar nanomedicina inteligente e multifuncional futura torna-se cada vez mais valioso, e assim sendo, são desenvolvidos muitos estudos a cerca disto (DAGLAR, B. *et al*, 2014).

Os nanocarreadores possuem importante papel na liberação direcionada de fármacos (LIN, CHANG, 2008) para um alvo específico. Essas partículas também possuem grande relevância quanto ao seu uso em técnicas de diagnóstico por imagem, o que as tornaram alvos de diversos estudos ao longo das últimas décadas (JOKERST *et al.*, 2011).

Os nanocarreadores atuam como vetores, podendo direcionar o fármaco até o local de interesse ou de ação dentro do organismo (LIN, CHANG, 2008). Por possuírem um tamanho reduzido, na ordem de nanômetros, essas partículas apresentam uma alta área superficial, favorecendo sua interação com os componentes de meio biológico. A interação com o meio biológico poderá ocasionar uma mudança em seu perfil de degradação, internalização pelas células e também podendo alterar o perfil de liberação do fármaco e sua biodistribuição no organismo (AVGOUSTAKIS. K. *et al*, 2002).

Dentre os diversos tipos de nanocarreadores (Figura 1), as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) se destacam devido à possibilidade de obtenção de partículas com diferentes características físico-químicas, de acordo com o tipo de polímero utilizado, e por possuírem maior estabilidade por diferentes vias de administração, quando comparadas a nanocarreadores não poliméricos, tais como os lipossomas e as nanoemulsões. (DISCHER., EISENBERG, 2002). Além disso, a presença do polímero na formulação é capaz de proteger o fármaco da degradação quando delineado adequadamente (LIN, CHANG, 2008).

Figura 1: Representação esquemática de nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) e lipídicas (nanoemulsões e lipossomas)

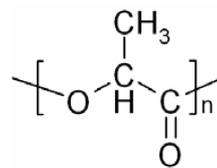


Fonte: Adaptado de Zorzi e colaboradores (2017)

2.2 Degradação de nanopartículas de poliéster biodegradável

Nanopartículas constituídas de polímeros biodegradáveis, tais como o poli(ácido láctico) (PLA) que é um poliéster alifático linear derivado de monómeros lactídeo (Figura 2) (HIRSJÄRVI, 2008) e seus copolímeros como o polietilenoglicol (PEG) são amplamente utilizadas como sistemas de liberação de fármacos devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradação (POUND-LANA *et. al.*, 2017). Além disso, esses polímeros também são utilizados em vários dispositivos médicos, como suturas, membranas de regeneração de tecidos, dispositivos de fixação óssea e sistemas para reparo de menisco e cartilagem (AMBROSE, CLANTON, 2004).

Figura 2: Poli (ácido láctico)



Fonte: Adaptado de HIRSJÄRVI (2008).

As ligações éster presentes na estrutura do PLA, favorece a degradação em ambiente aquoso na presença de esterases (VERT, 2005). Os produtos de degradação são biocompatíveis e metabolizáveis, podendo ser metabolizados pelo corpo no ciclo do ácido cítrico gerando como produto final CO₂ e água (AVGOUSTAKIS *et al.*, 2002).

Segundo Belbella e colaboradores (1996) o processo de degradação de nanopartículas de PLA em meio aquoso pode ocorrer por dois mecanismos:

- I. Erosão superficial, que ocasiona uma diminuição da massa total do polímero;

- II. Erosão no volume, onde ocorre a clivagem da cadeia polimérica em processo aleatório, levando a uma rápida queda da massa molar do polímero.

O processo de degradação em meio aquoso ocorre devido à hidrólise da cadeia polimérica em massa envolvendo um ataque em toda a matriz polimérica. Nos estágios iniciais ocorre pouca degradação e o meio aquoso pode difundir-se pela matriz polimérica. Nos estágios mais avançados ocorre a formação de poros e o polímero é tomado pela água, resultando na aceleração da hidrólise (BELBELLA *et al*, 1996).

O processo de degradação em meio aquoso pode ser influenciado por alguns fatores, tais como pH e temperatura e, cinética de degradação do polímero a partir da nanopartícula, pode ser avaliada de acordo com a variação da massa molar e do tamanho das partículas. A velocidade de degradação *in vitro* das nanopartículas depende de sua composição, sendo caracterizadas quanto à morfologia, tamanho, potencial de superfície ou carga superficial e massa molar do polímero (AVGOUSTAKIS *et al*, 2002).

2.2.1 Influência do pH

Um dos fatores que sabidamente influencia o processo de degradação de poliésteres é o pH, sendo que este pode afetar tanto a massa molar do polímero quanto a morfologia das partículas. A condição ácida do meio catalisa a hidrólise de ligações éster, o que leva a um processo de erosão mais rápido de nanopartículas constituídas por poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (JAIN *et al*, 2010; CHU *et al*, 2016).

O meio ácido conduz a cortes aleatórios ao longo da cadeia polimérica de PLA, o que resulta na diminuição da massa molar do polímero. Além disso, a presença de mais ou menos oligômeros solúveis em água, pode ter um importante papel na catálise da hidrólise (BELBELLA. *et al*, 1996).

2.2.2 Influência da Temperatura

De forma geral a taxa de degradação de poliésteres aumenta conforme ocorre uma elevação da temperatura. Dunne e colaboradores (2000), demonstraram em seu estudo que partículas esféricas de poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) em temperaturas de incubação mais baixas, não apresentou perda de massa durante o período de estudo (período de indução após o qual prosseguiu a degradação do polímero). Entretanto um perfil de perda de massa do

polímero foi observado para as temperaturas mais altas, dessa forma, verificou-se que a taxa de degradação do polímero aumenta em temperaturas de incubação mais elevadas.

A avaliação da influência da temperatura na degradação polimérica é necessária, tanto para investigação com relação a perda da massa molar do polímero, quanto para entender como esta pode atuar levando a alterações de suas propriedades, tais como cor e forma.

2.3 Alterações ocasionadas pela degradação polimérica

2.3.1 Morfologia das nanopartículas

O processo de degradação parece iniciar a partir da superfície do polímero, principalmente em sua região amorfa. Ou seja, a erosão de superfície induz a degradação polimérica em cadeias mais curtas, que pode levar a dissolução destas e resultar na redução do peso molecular das cadeias poliméricas (LIN, CHANG, 2008).

Jain e colaboradores (2010) realizaram um estudo de estabilidade com nanopartículas de PLGA incubadas em meio tamponado (pH 7,4) e, através de análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), observaram que nenhuma agregação foi visível entre as partículas e elas não apresentaram qualquer porosidade interna ou externa antes da exposição ao meio de incubação. Após a incubação das amostras, iniciou-se o processo de erosão e a partir do quinto dia de seu estudo, foi observada a formação de microcavidades na superfície da nanopartícula, as quais aumentaram com o tempo. Após três semanas o efeito do meio de incubação sobre as alterações na morfologia interna das nanopartículas de PLGA tornou-se significativo e após a quarta semana já era possível notar a agregação de partículas. Observou-se um aumento na porosidade das nanopartículas que foi proporcional ao tempo de degradação. Dessa forma, o estudo demonstrou que com o decorrer do período de incubação há uma agregação das partículas e também um aumento na porosidade, que é proporcional ao tempo de erosão, e que conforme há aumento no tempo de degradação pode ocorrer a fragmentação das partículas, o que pode levar a agregação destas.

2.3.2 Tamanho de nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas é avaliado em função do tempo de degradação. Jain e colaboradores (2010) demonstraram em seu estudo que, inicialmente, em um período de degradação de 3-4 semanas é observado um aumento no tamanho das nanopartículas de PLGA incubadas em meio tamponado (pH 4,4), indicando a ocorrência de formação de agregados. O

efeito de aumento de tamanho de partículas é observado, principalmente, quando estas são incubadas em valores extremos de pH, ocorrendo a formação de tais agregados (BELBELLA *et al*, 1996). Com o decorrer do tempo e envelhecimento das partículas, a tendência é que ocorra uma diminuição em seu tamanho (JAIN *et al*, 2010).

2.4 Avaliação da degradação polimérica em nanopartículas

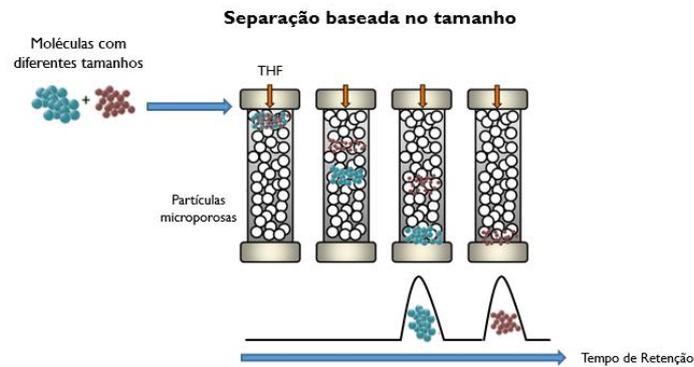
Dentre as diversas técnicas utilizadas para avaliação da degradação polimérica em nanopartículas, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); determinação do tamanho e potencial de superfície ou carga superficial das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS; Zetasizer Nano ZS); microscopia eletrônica de varredura para avaliação da morfologia da nanopartículas, observadas em diversos estudos, foram escolhidas para esse estudo o uso da técnica de cromatografia por permeação em gel que permite avaliar a perda de massa molar do polímero nas nanopartículas, e, também, o uso da técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico acoplado a detectores de espalhamento dinâmico e estático da luz que permite a caracterização de sistemas coloidais e também de macromoléculas, promovendo a separação dos coloides em ampla distribuição de tamanho. Dessa forma, as amostras de nanopartículas serão caracterizadas quanto a variação de massa molar e a distribuição de massas molares de polímeros e, também, quanto a variação de tamanho das nanopartículas.

2.4.1 Caracterização por cromatografia por permeação em gel

A integridade da cadeia polimérica presente na nanopartícula pode ser avaliada através de análises por cromatografia de permeação em gel (GPC), uma vez que essa técnica é utilizada para determinar a massa molar e a distribuição de massas molares de polímeros.

Essa técnica consiste na separação de macromoléculas de acordo com seus tamanhos moleculares à medida que a solução da amostra flui através de um leito de resinas com poros de tamanho bem determinado (CHENG *et al*, 2018). Nessa análise os polímeros com cadeias de maior tamanho eluem mais rapidamente e os de menor tamanho permeiam entre os poros e eluem mais tardiamente (TROPNER, 2018), conforme ilustrado na figura 3.

Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos de separação de moléculas por cromatografia de permeação em gel.



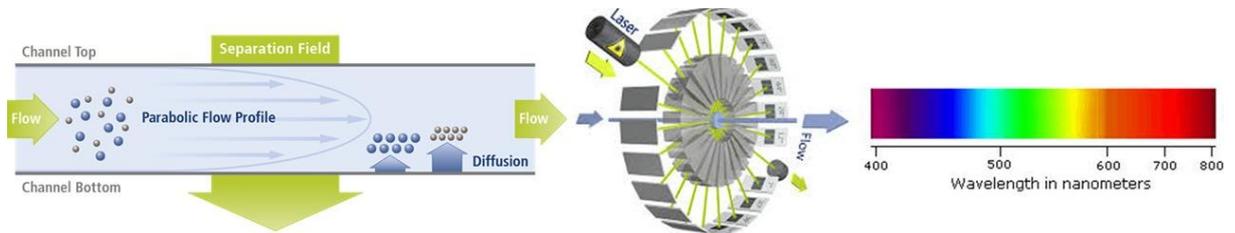
Fonte: Adaptado de

<http://www.skz.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4873.Gel-permeation-chromatography--GPC.html>

2.4.2 Caracterização por fracionamento em campo de fluxo assimétrico acoplado a detectores de espalhamento dinâmico e estático da luz (AF4-DLS-MALS)

A técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) é utilizada para caracterização de sistemas coloidais e também de macromoléculas, promovendo a separação dos coloides em ampla distribuição de tamanho. Tal técnica não utiliza uma fase estacionária para separar os analitos, mas consiste em um canal estreito no qual a amostra é eluída por um líquido carreador aquoso. São aplicados fluxos cruzados perpendiculares de forma que a amostra é submetida a um campo de fluxo parabólico. Assim a amostra tem os seus componentes separados em função do coeficiente de difusão de cada macromolécula ou partícula. A análise da amostra é realizada em duas etapas principais: uma etapa inicial de foco, seguida de uma etapa de separação. Sendo que a etapa de focagem é fundamental para minimização do alargamento do pico durante a injeção da amostra e geração de picos estreitos (MUDALIGE *et al*, 2015). A técnica é esquematizada na figura 4.

Figura 4: Representação esquemática dos mecanismos de separação de moléculas por fracionamento em campo de fluxo assimétrico



Fonte: Adaptado de: < <http://www.postnova.com/asymmetric-flow-fff.html> >

Quando o equipamento de AF4 é acoplado a detectores de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) e estático (MALLS, do inglês *multi angle laser light scattering*), é possível realizar uma caracterização mais completa das formulações nanoestruturadas, obtendo-se informações sobre a distribuição de tamanho e a forma das partículas e mesmo a determinação do peso molecular absoluto de macromoléculas (PAULA, 2016). Com isso, a técnica de AF4-DLS-MALLS permite avaliar alterações no tamanho das nanopartículas em diferentes meios aquosos em relação ao tempo, e dessa forma contribui para a determinação da cinética de degradação dos polímeros em sua forma nanoestruturada.

3. JUSTIFICATIVA

Os nanocarreadores constituem sistemas amplamente estudados dentro da área farmacêutica nas últimas décadas, no intuito de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos, uma vez que possuem um importante papel na liberação controlada e direcionada de fármacos e no diagnóstico por imagem (JOKERST *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016).

Copolímeros em bloco de PLA com PEG tem permitido a encapsulação de fármacos em sistemas de autoagregação como as micelas e nas nanopartículas. As nanopartículas poliméricas apresentam destacada estabilidade coloidal *in vitro* e frente a diluição e permitem a alteração da biodistribuição *in vivo* em relação a alguns tipos de nanocarreadores, podendo ser administrados por via oral ou endovenosa. (MELLO, *et al.*, 2016). O PLA possui a vantagem de ser biodegradável. Quando degradado no organismo, os seus produtos de degradação são metabolizados no ciclo de Krebs e, portanto, apresenta alta biocompatibilidade. (BELBELLA, *et al.*, 1996)

A utilização do polímero em formulações farmacêuticas proporciona uma proteção ao fármaco e auxilia na liberação do fármaco no sítio de ação farmacológica (LIN.W, CHANG. K, 2008). No entanto, devido à sua natureza biodegradável, o PLA pode sofrer degradação em meio aquoso, especialmente, quando na forma nanoestruturada, com uma área superficial alta oferecendo uma superfície de contato com o meio aquoso elevada. Além disso, fatores como pH extremos, como o do trato gastrointestinal por exemplo, quando administrados por via oral, favorece à degradação hidrolítica (AVGOUSTAKIS. K. *et al.*, 2002). Sendo assim, é importante avaliar a estabilidade do PLA em nanocarreadores poliméricos no intuito de determinar o tempo de meia-vida na forma nanoestruturada para o seu armazenamento e para a compreensão do seu comportamento após administração.

Dessa forma, este estudo faz-se necessário, uma vez que visa à caracterização da cinética de degradação de nanovetores poliméricos à base de PLA susceptíveis a degradação hidrolítica em meio biológico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar a cinética de degradação de nanopartículas (NP) de polímero biodegradável derivado do polilactídeo, PEG- PLA em meio aquoso.

4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um método usando a técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) para determinar a massa molar do polímero antes e após incubação em diversos meios;
- Elaborar uma curva de calibração por GPC para avaliar a quantidade (massa) de polímero presente em amostras de formulações de nanoesferas de PEG-PLA;
- Avaliar o tamanho das NP antes e após incubação em diversos meios aquosos;
- Identificar condições favorecendo a degradação das NP e/ou dos polímeros e assim definir condições para a avaliação dessas NP como nanocarreadores farmacêuticos em estudos pré-clínicos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

Os solventes acetona (PA, VETEC), tetrahidrofurano (THF, grau HPLC, JT Baker, estabilizado com 250 ppm de ditertiobutilhidroxitolueno) foram usados sem purificação. Foi utilizado meio de cultivo de células (DMEM) suplementado com 10% soro bovino fetal (FBS). Água ultrapura foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore, USA). Os copolímeros em bloco PEG_{2k}PLA_{20k} e PEG_{5k}PLA_{20k} foram obtidos por polimerização por abertura de anel do D,L-lactídeo a partir de polietileno glicol monometil éter de massa molar 2000 g/mol e 5000 g/mol, respectivamente (Sigma) realizada em massa a 120°C sob atmosfera de argônio e catalisada por 2-etilhexanoato de estanho, como descrito em Pound-Lana *et al.* (2017).

Equipamentos:

- Cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity acoplado a um detector UV Agilent 1260 Infinity (G1314F) e um detector de índice de refração diferencial (G1362A RID a 35°C) em série, utilizando uma pré-coluna Varian PL gel 5 µm MiniMix-D 50×4,6 mm e duas colunas Agilent PL gel 5 µm MiniMix-D 250×4,6 mm em série mantidas a 30°C.
- Fracionamento por campo de fluxo assimétrico (AF4) acoplado a detectores de UV (254 nm), espalhamento estático da luz (MALS) e fluorescência (FLD) (Postnova Analytics AF2000 MT) de acordo com a metodologia adaptada de POUND-LANA *et al.* (2017).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 *Elaboração de uma curva de calibração por GPC*

A metodologia descrita abaixo foi elaborada para a determinação da massa molar do polímero após incubação em meios de degradação e quantificação do polímero nas amostras de nanopartícula (NP).

Para a elaboração da curva de calibração amostras foram preparadas utilizando dois polímeros (para avaliar a influência da composição química do polímero na variação de índice de refração):

- copolímero PEG_{5k}PLA_{20k};
- copolímero PEG_{2k}PLA_{20k};

Os polímeros foram solubilizados em THF na concentração de 2.0 mg/mL (solução estoque, SE). A SE e um volume suficiente de THF estabilizado foram filtrados (filtro de poro 0,2 µm PVDF, Millipore®) e as amostras foram preparadas por diluição seriada (1:1, 6 pontos – 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063 mg/mL) para elaboração da curva de calibração relacionando a altura ou a área sob a curva do sinal de RI em função da concentração de polímero.

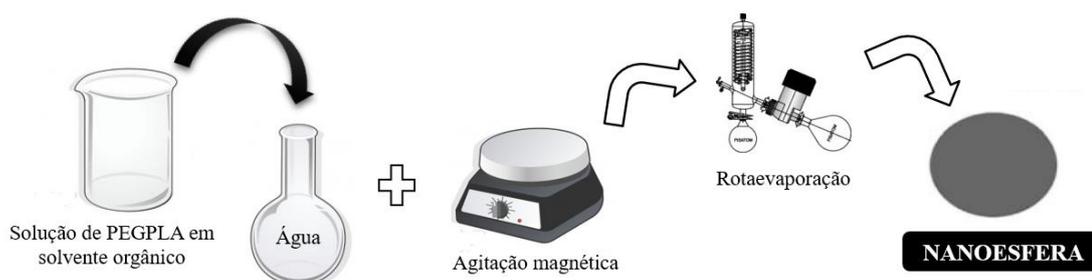
As amostras de polímero foram analisadas por GPC em um cromatógrafo acoplado a um detector de absorção no UV (absorbância em 254 nm) e um detector de índice de refração (RI) em série. A fase móvel utilizada foi composta por tetraidrofurano (THF) de grau HPLC estabilizado com 250 ppm de BHT como eluente, a um fluxo de 0,25 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL.

O sistema foi calibrado em termos de relação entre tempo de retenção e massa molar do polímero utilizando padrões de poliestireno de dispersão estreita Agilent Technologies EasiVial (162-371.100 g/mol) e os resultados foram analisados utilizando o Agilent GPC/SEC Software.

5.2.2 Preparo de nanoesferas (NS) pelo método de nanoprecipitação

As nanoesferas foram obtidas pelo método de nanoprecipitação (FESSI *et al*, 1989), conforme esquematizado na figura 5. Para o preparo das NP foram pesados 100 mg de cada polímero para sua respectiva formulação, que foram solubilizados em 10 mL de acetona, cada um em seu respectivo béquer. A solução de cada polímero em acetona foi vertida em um balão contendo 20 mL de água ultrapura, sob agitação magnética a temperatura ambiente e a suspensão obtida mantida sob agitação magnética durante 10 minutos. A acetona e parte da água foram evaporadas sob pressão reduzida utilizando um rotaevaporador até um volume final de 10 mL, obtendo-se assim duas suspensões de nanoesferas (NS) referente a cada polímero a uma concentração final de 10 mg/mL de polímero.

Figura 5: Representação esquemática de preparo de NS pelo método de nanoprecipitação



5.2.3 Quantificação do polímero em amostras de NS por GPC

Para quantificação dos polímeros nas formulações de NS, foi preparada uma amostra pipetando 100 μL de cada formulação que foram diluídos em 900 μL de THF, após as amostras foram filtradas utilizando um filtro de 0,2 μm PVDF Millipore e o teor de polímero foi verificado pelo método de GPC usando a curva de calibração conforme descrito acima.

5.2.4 Estudo da degradação do polímero nanoestruturado

O estudo de degradação foi realizado durante 16 dias, visando observar a ocorrência de alteração na massa molar e na distribuição de massas molares do polímero por GPC, e também, variações no tamanho das NS por AF4-DLS-MALLS.

As nanoesferas foram incubadas sob as seguintes condições:

1. a 37°C em água: As amostras já são preparadas em água. Para incubação das amostras foram pipetados 2 mL de cada formulação (NS-PEG_{5K}PLA_{20K} e NS-PEG_{2K}PLA_{20K}) em tubos eppendorfs e mantidos sob agitação em banho maria na temperatura descrita.
2. a 37°C em HCl – pH 1,0: Primeiramente foi preparada uma SE a uma concentração de 1,0mM de HCl. Para isso foram pipetados 100 μL de uma solução de HCl (37%) a uma concentração de 10,0mM, que foi diluído em 900 μL de água ultrapura. Para incubação das amostras no meio ácido foram pipetados 1,8 mL de cada formulação (NS-PEG_{5K}PLA_{20K} e NS-PEG_{2K}PLA_{20K}) em tubos eppendorfs e acrescentados a estas, 200 μL da SE de HCl a uma concentração de 1,0mM. As amostras foram mantidas sob agitação em banho maria na temperatura descrita. O pH das amostras (1,0) foi confirmado utilizando tiras de pH (pH-fix-0-14.Macherey-Nagel (MN)).
3. a 37°C em meio de cultivo de células suplementado com 10% de soro fetal bovino (DMEM/FBS): Foram pipetados 2,0 mL de cada formulação (NS-PEG_{5K}PLA_{20K} e NS-PEG_{2K}PLA_{20K}) em tubos Falcon de 50 mL e acrescentados a estas 4,0 mL do meio de cultivo de células suplementado com 10% de soro fetal bovino. As amostras foram mantidas sob agitação em banho maria na temperatura descrita.

Amostras foram coletadas nos dias 01, 02, 08 e 16 para análises de GPC e AF4.

5.2.4.1 Preparo das amostras para análise por GPC

Para análise de GPC, as amostras foram preparadas da seguinte forma:

1. a 37°C em água: As amostras foram preparadas diluindo 100 μL das formulações no meio

de incubação em 900 μL de THF estabilizado com BHT, após as amostras foram filtradas utilizando um filtro de 0,2 μm PVDF Millipore.

2. a 37°C em HCl – pH 1,0: As amostras foram preparadas pipetando 100 μL , de cada formulação incubadas em HCl, em um vial e estas amostras foram neutralizadas com 10 μL de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3)* para interromper o processo de degradação até aquele momento. O pH das amostras foi confirmado utilizando tiras de pH (pH-fix-0-14. Macherey-Nagel (MN)). Após neutralizadas, as amostras foram diluídas em 900 μL de THF estabilizado com BHT, e, posteriormente, foram filtradas utilizando um filtro de 0,2 μm PVDF Millipore.
3. (37°C em meio DMEM com 10% FBS): As amostras foram preparadas pipetando 300 μL , de cada formulação em DMEM/FBS em um eppendorf, onde foram acrescentados 1,5 mL de acetonitrila para solubilização das NP e precipitação das proteínas. Foi feita a centrifugação destas amostras por três minutos à uma velocidade em torno de 2,0 x 1000g (Centrifuge 5415D) e, após esta centrifugação, foi feita a coleta de todo o sobrenadante que foi colocado em um vial que foi mantido a vácuo em dessecador para a evaporação do solvente. Tendo o solvente evaporado, foi feita a solubilização do polímero em 1 mL THF estabilizado com BHT, após as amostras foram filtradas utilizando um filtro de 0,2 μm PVDF Millipore.

***Preparo da solução de NaHCO_3** : Para o preparo da solução, foram pesados 840 mg de NaHCO_3 que foram diluídos em 10 mL de água ultrapura. A solução foi mantida sob agitação até completa solubilização do NaHCO_3 .

5.2.4.2 Preparo das amostras para análise por AF4-DLS-MALLS

Para análise de AF4-DLS-MALLS, as amostras foram preparadas da seguinte forma:

1. a 37°C em água e a 37°C em HCl: As amostras foram preparadas diluindo 80 μL das formulações em cada um dos meios de incubação em 160 μL de cloreto de sódio (NaCl) a uma concentração de 10mM. As amostras foram preparadas em inserts que foram colocados nos vials, e posteriormente, analisados utilizando a técnica de AF4-DLS-MALLS.
2. (37°C em meio DMEM com 10% FBS): Tais amostras não foram diluídas em NaCl como as demais. Para estas formulações foram adicionadas 240 μL de cada uma das formulações incubadas em DMEM/FBS nos inserts, foram colocados em vials, e posteriormente, analisados utilizando a técnica de AF4-DLS-MALLS.

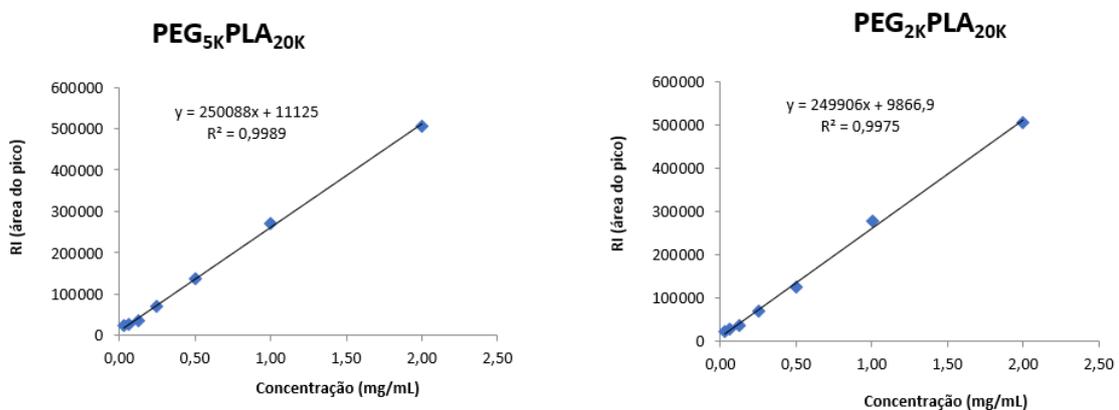
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Elaboração da curva de calibração por cromatografia por GPC

A técnica de GPC fornece a separação dos analitos em função do seu diâmetro hidrodinâmico, proporcional à sua massa molar. A separação é realizada por eluição do analito em solução atravessando uma coluna com fase estacionária porosa. Desse modo moléculas com maior massa molar apresentam um menor tempo de retenção (CHENG *et al*, 2018). O método de GPC é usado para determinar a massa molar e a distribuição de massas molares de polímeros e neste trabalho essa técnica foi aplicada para quantificar também a massa de polímero em uma amostra.

A partir da área sob a curva do sinal de índice de refração (RI) para cada uma das concentrações analisadas foi possível obter uma curva de calibração e, a partir desta, foi obtida uma relação linear entre a concentração de polímero em solução e a área sob a curva do sinal de RI. Determinou-se a equação da reta obtida por regressão linear aplicada aos dados experimentais. Ambas as curvas obtidas para cada um dos polímeros apresentaram boa linearidade, que pode ser confirmado pelo valor do coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99. As curvas de calibração dos dois polímeros utilizados para o preparo das formulações são representadas na figura 4. Utilizando a curva de calibração foi possível fazer a quantificação do polímero extraído das suspensões de NP, conforme será descrito no item 6.2.

Figura 6: Curvas de calibração relacionando a área sob o pico do sinal de índice de refração nos cromatogramas de GPC à concentração do polímero na amostra.



6.2 Quantificação do polímero em amostras de NP por GPC

Como descrito no procedimento 5.3, foram preparadas suspensões de nanoesferas referente a cada polímero a uma concentração de 10 mg/mL de polímero. Após a análise pelo método de GPC, o teor de polímero foi verificado usando a curva de calibração. Foi encontrada uma concentração de 7,3 mg/mL de polímero na NS-PEG_{5k}PLA_{20k} o que significa uma taxa de recuperação de 73%, e para NS-PEG_{2k}PLA_{20k} foi encontrada uma concentração de 6,3 mg/mL, o que significa uma taxa de recuperação de 63%. Esta é considerada uma boa taxa de recuperação, uma vez que, podem ocorrer perdas durante o preparo das NS, visto que podem ficar resíduos aderidos ao balão e também podem ocorrer perdas durante o preparo das amostras para as análises por GPC, o que impossibilita uma taxa de recuperação de 100%.

Tabela 01: Quantificação do polímero em amostras de NP por GPC

Polímeros constituintes nas NS	Equação da Reta	Área do Pico	Concentração na amostra (mg/mL)
PEG _{5k} PLA _{20k}	$y = 250088x + 11125$	193576	0,73
PEG _{2k} PLA _{20k}	$y = 249906x + 9866,9$	166369	0,63

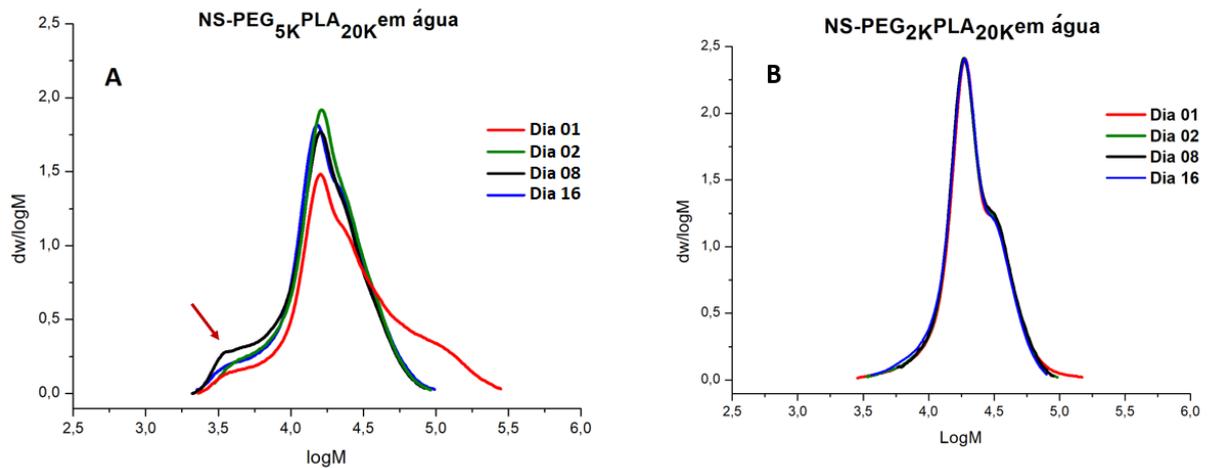
Onde o eixo x é o valor da concentração em polímero no vial de GPC (mg/mL) e o eixo y o valor da área sob o pico do sinal de índice de refração determinado por integração da área correspondendo ao polímero, após seleção de uma linha de base ambos selecionados manualmente no software associado ao GPC.

6.3 Estudo da degradação do polímero por GPC

6.3.1 Degradação em meio aquoso

A formulação de NS-PEG_{5k}PLA_{20k} apresentou perfis de distribuição parecidos ao longo do tempo, sendo observado um ombro de menor massa molar de proporção crescente com o aumento do tempo de incubação, indicado pela seta na figura 7-A. A formulação de NS-PEG_{2k}PLA_{20k} se manteve estável durante todo o período de análise, apresentando uma sobreposição dos cromatogramas por GPC ao longo dos 16 dias do estudo, indicando a manutenção da distribuição de massas molares, como observado na figura 7-B.

Figura 7: Cromatogramas do estudo de estabilidade na água pH 7, A (PEG_{5k}PLA_{20k}) e B (PEG_{2k}PLA_{20k}) dos polímeros na sua forma nanoestruturada.

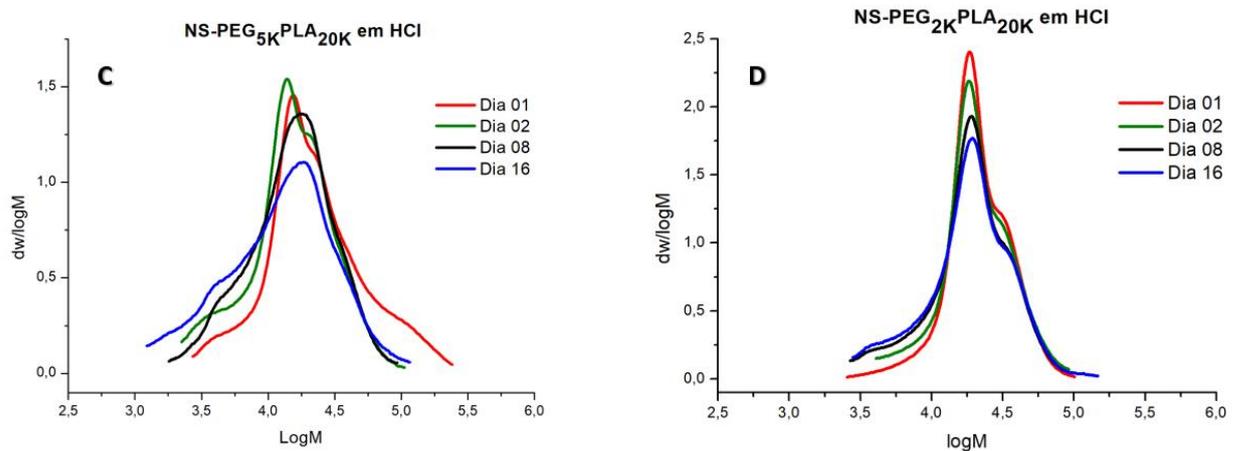


A seta indica o ombro de massa molar menor detectado nos cromatogramas da formulação NS- PEG_{5k}PLA_{20k} em meio aquoso.

6.3.2 Degradação em meio ácido

As amostras em HCl apresentaram um alargamento da distribuição de massas molares e decréscimo da massa molar média do polímero com o decorrer do experimento, indicativo da degradação progressiva dos polímeros. Foi possível observar a formação de precipitado nos tubos contendo as amostras, sendo que NS-PEG_{2k}PLA_{20k} apresentou maior quantidade de precipitado. A formação de precipitado indica uma perda de estabilidade coloidal das NP, o que sugere a degradação das amostras, mas não necessariamente a alteração da massa molar dos seus constituintes. O perfil de degradação das cadeias poliméricas e evolução das massas molares determinada por GPC sugere que a perda de estabilidade coloidal possa ser relacionada à degradação hidrolítica do polímero. A alteração das massas molares em função do tempo de degradação das formulações é apresentada na figura 8-C (NS-PEG_{5k}PLA_{20k}) e D (NS-PEG_{2k}PLA_{20k}).

Figura 8: Cromatogramas do estudo de estabilidade em HCl pH 1,0; C (PEG_{5k}PLA_{20k}) e D (PEG_{2k}PLA_{20k}) dos polímeros na sua forma nanoestruturada.

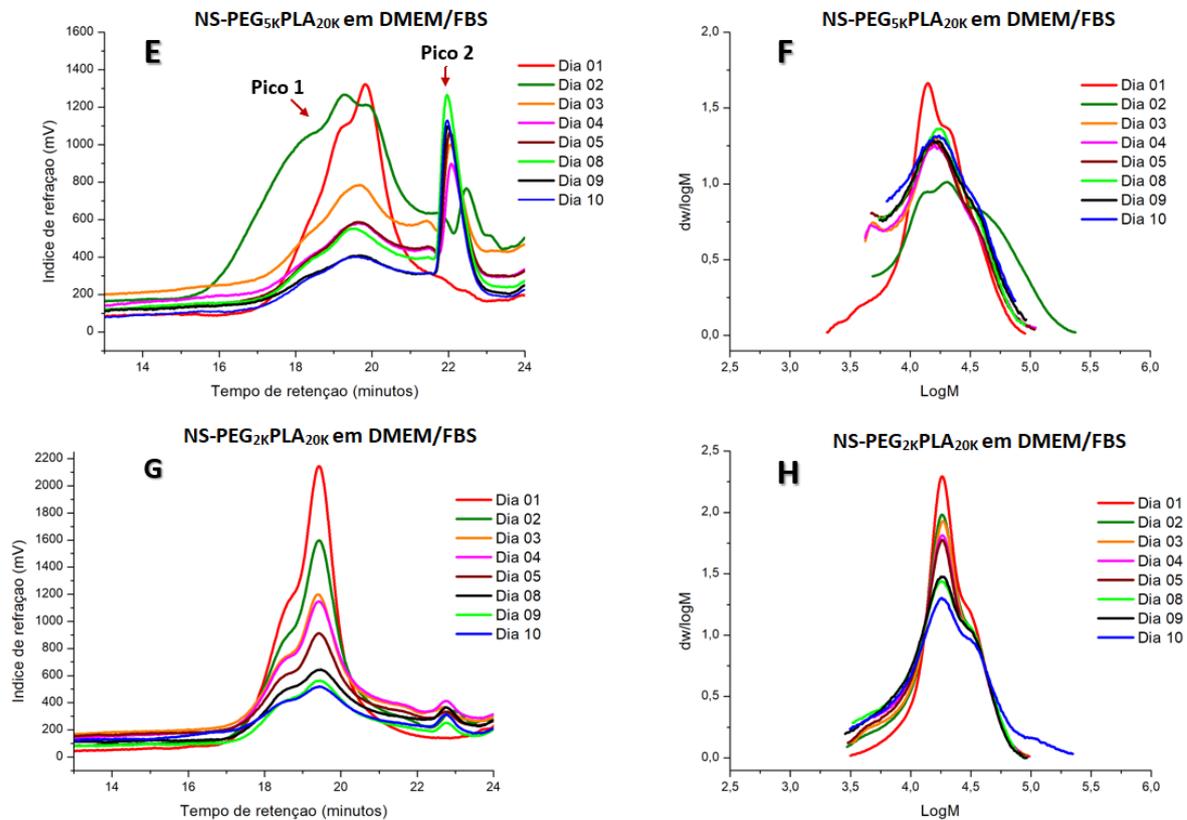


6.3.2 Degradação em meio contendo DMEM/FBS

As amostras incubadas em meio DMEM contendo FBS apresentaram um perfil de degradação mais rápido, necessitando análises diárias. A formulação de NS-PEG_{5K}PLA_{20K} em DMEM/FBS apresentou um novo pico em seu cromatograma por GPC, que está indicado pela seta na figura 9-E, de massa molar baixa ($M_n = 3000$ g/mol) em relação ao polímero original, presente a partir do segundo dia de exposição e que se manteve constante em todas as análises de amostras posteriores. Este novo pico pode indicar a hidrólise do bloco de PEG, porém, os detectores de UV (254 nm) e RI, usados para análise das frações por GPC não trazem informação específica sobre a composição química das frações. Ambas as amostras em DMEM/FBS apresentaram ainda, um alargamento da distribuição de massas molares e decréscimo da massa molar média do polímero em função do tempo de degradação, indicativo da degradação progressiva dos polímeros. Para a formulação de NS-PEG_{2K}PLA_{20K} em DMEM/FBS não houve a formação deste novo pico em seu cromatograma, como para a formulação de NS-PEG_{5K}PLA_{20K}.

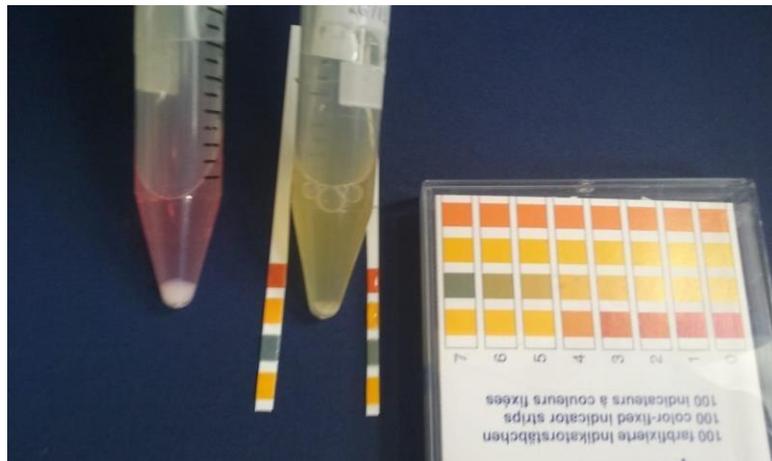
Os gráficos do perfil de degradação por GPC das formulações em FBS são representados na Figura 9, sendo que a esquerda é representado o cromatograma obtido pelo sinal de índice de refração (figura 9-E e G) a direita é representada a distribuição de massas molares correspondente (figura 9-F e H).

Figura 9: Estudo por cromatografia de permeação em gel da estabilidade em meio DMEM/FBS dos polímeros na sua forma nanoestruturada. As distribuições de massas molares (F e H) foram determinadas a partir dos cromatogramas (E e G, respectivamente) das amostras de NS-PEG_{5K}PLA_{20K} (acima) e NS-PEG_{2K}PLA_{20K} (abaixo).



Ambas as amostras apresentaram mudança de coloração e formação de precipitado com o decorrer do tempo de degradação, também ocorreu mudança de pH observada pela mudança de coloração do vermelho de fenol, que é um indicador de pH, presente no meio de cultura e a formulação de NS-PEG_{2K}PLA_{20K} passou a apresentar odor desagradável. O pH das amostras foi confirmado utilizando tiras de pH (pH-fix-0-14. Macherey-Nagel (MN)), sendo que o pH NS-PEG_{2K}PLA_{20K} estava em torno de 6,0 no 15º dia de incubação das amostras, e o da NS-PEG_{5K}PLA_{20K} estava em torno de 7,0, no mesmo dia de análise. O pH inicial do meio de cultivo era em torno 8,0. O aspecto das formulações pode ser observado na figura 10. A esquerda é representada a formulação de NS-PEG_{5K}PLA_{20K} e a direita a formulação de NS-PEG_{2K}PLA_{20K}. Em ambas as amostras pode ser observada a formação de precipitado no fundo, e pode ser observado também que a formulação de NS-PEG_{2K}PLA_{20K} apresentou uma coloração amarelada, enquanto a formulação de NS-PEG_{5K}PLA_{20K} apresentou uma coloração rosada, perdendo um pouco da coloração do meio de cultura proveniente do indicador de pH.

Figura 10: Aspecto das formulações de NS-PEG_{5K}PLA_{20K} (tubo à esquerda) e NS-PEG_{2K}PLA_{20K} (tubo à direita) em DMEM contendo FBS e avaliação do seu pH após 15 dias a 37 °C



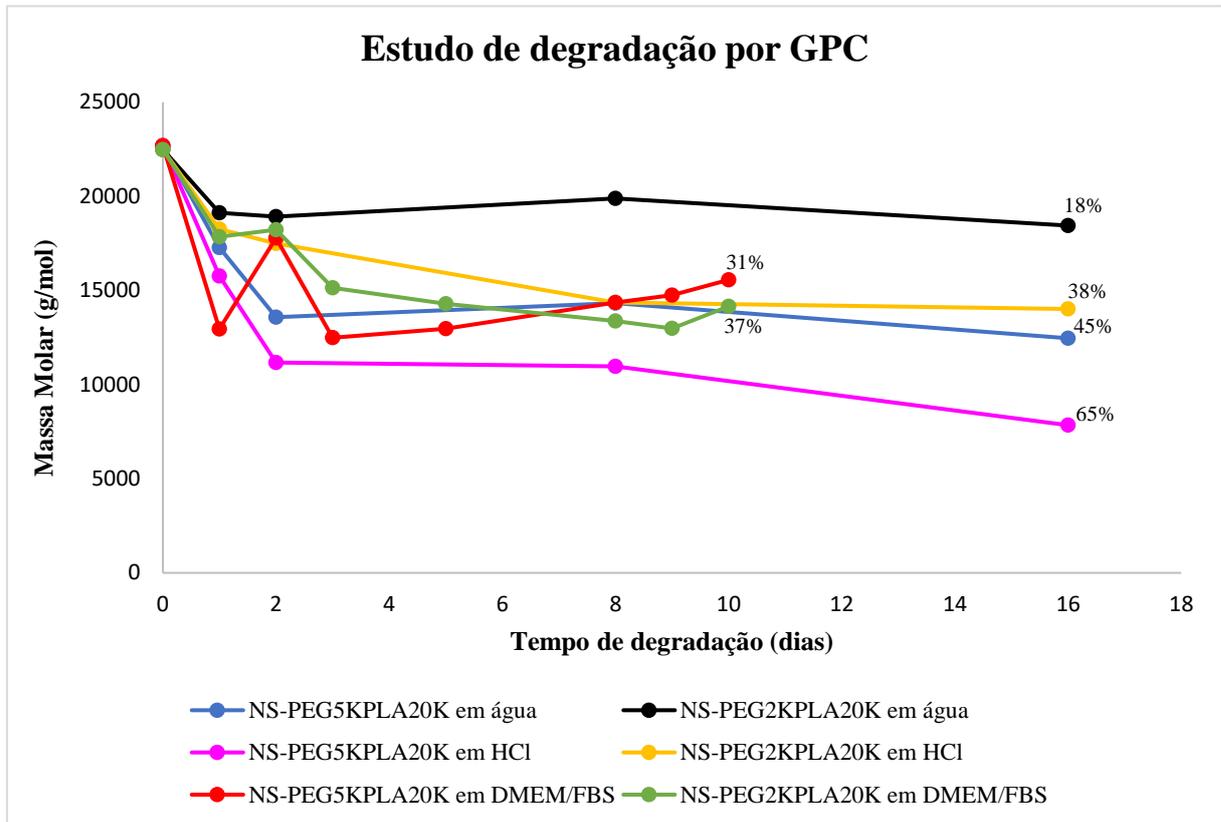
Fonte: Acervo do autor.

Esperava-se fazer uma análise complementar por RMN-1H a fim de obter informações relativas à composição do polímero recuperado na forma de precipitado. Desta forma, as amostras em DMEM/FBS foram centrifugadas por cinco minutos à uma velocidade em torno de 500x g. Foi feito o descarte do sobrenadante e o resíduo sólido de ambas as amostras foi lavado adicionando 1mL de água ultrapura aos tubos contendo precipitado, estes foram mantidos sob agitação no vórtex para agitação e ressuspensão do precipitado. As amostras foram novamente centrifugadas e após feito o descarte do sobrenadante. Este processo foi repetido três vezes e foi feita então a extração do precipitado contido nos tubos. No entanto, a quantidade de precipitado que havia era pequena (aproximadamente 1,3 mg) e este não foi solúvel em solvente orgânico, o que impossibilitou este tipo de análise. A insolubilidade do precipitado em clorofórmio deuterado (CDCl_3) sugere que este não seja composto pelo polímero PLA ou seu copolímero PEGPLA, sendo estes totalmente solúveis no CDCl_3 . Uma hipótese é que seja formado por proteínas presentes no FBS possivelmente reticuladas na presença dos polímeros e dos sais contidos no meio. O odor desagradável da formulação NS-PEG_{2K}PLA_{20K}, mudança de pH informada pela mudança de cor do meio e presença de agregados contendo proteínas sugere uma contaminação microbiana favorecida pelo meio de cultura e temperatura fisiológica.

A partir dos valores de massas molares médias das amostras, foi possível construir um gráfico relacionando os valores de massas molares médias determinados por GPC em função do tempo de degradação. Também foi possível calcular as porcentagens de perda durante todo período de degradação em relação à amostra original, no gráfico é destacado o percentual de

perda de massa molar de cada amostra ao final do estudo. O gráfico é representado abaixo, na figura 11

Figura 11: Gráfico de análise das massas molares das formulações nos meios de incubação ao longo de todo estudo. (Ao final é representado o percentual de perda de massa molar de cada amostra em seu meio de incubação)



Conforme analisado no gráfico acima (Figura 11), foi possível observar uma diminuição da massa molar do polímero em função do tempo de degradação, que era um resultado esperado, bem como a perda de estabilidade das suspensões coloidais que pôde ser avaliada visualmente através da formação de precipitado indicando a agregação de partículas no meio. O processo de degradação pode ser explicado por uma erosão superficial ou no volume, o que leva a clivagem da cadeia polimérica em processo aleatório, ocasionando uma diminuição da massa total do polímero (BEBELLA *et al*, 1996).

As amostras incubadas em DMEM/FBS mostraram, inicialmente, um perfil de degradação em termos de massa molar do polímero mais rápido quando comparadas às amostras em água pH 7,0 ou em HCl pH 1,0. A diminuição da massa molar dos polímeros, observada através das análises por GPC, pode ser explicada pela hidrólise da cadeia polimérica.

As amostras em pH ácido quando em relação as amostras em água (pH 7) apresentaram um maior percentual de perda com relação a massa molar do polímero. Conforme observado nos estudos de Jain e colaboradores.,2010 e Chu e colaboradores, 2016 a condição ácida do meio catalisa a hidrólise de ligações éster, o que leva a um processo de erosão mais rápido de nanopartículas.

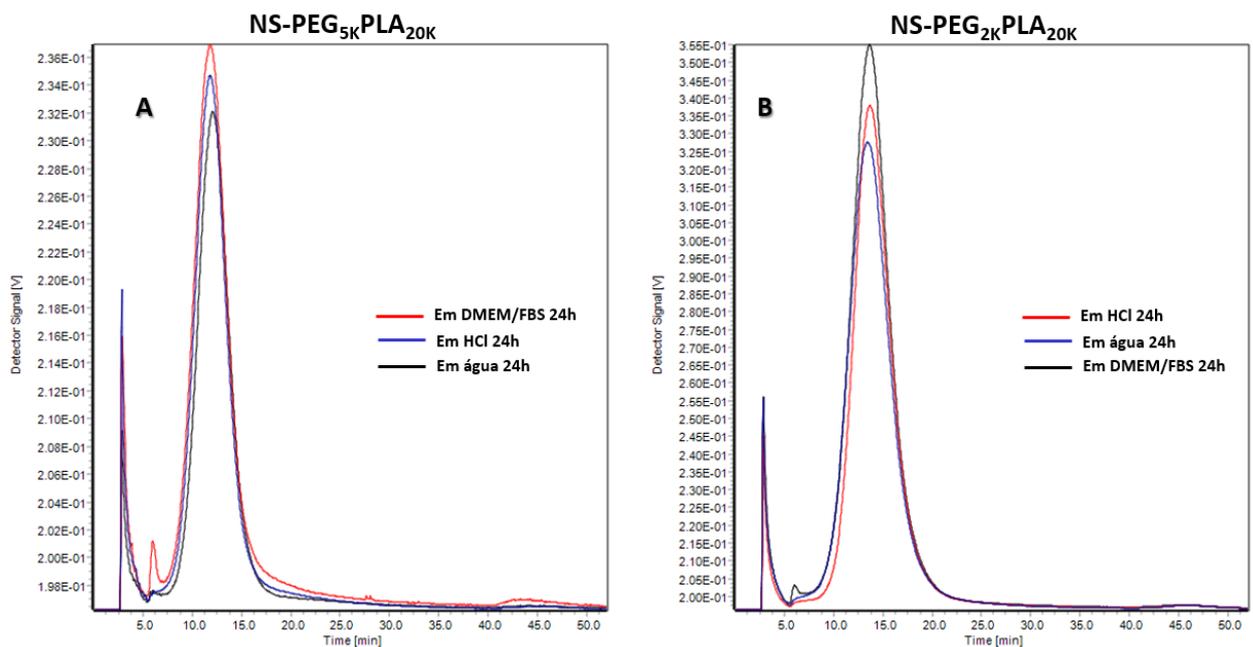
As formulações de NS-PEG_{5k}PLA_{20k} apresentaram uma degradação química das cadeias poliméricas mais acentuada que as formulações de NS-PEG_{2k}PLA_{20k}, em todos os meios, o que não era um resultado esperado. A degradação polimérica em meio aquoso é uma hidrólise em massa que envolve um ataque a toda matriz polimérica. Inicialmente, a degradação é mais lenta e o meio aquoso pode difundir-se na matriz; já nos estágios mais avançados ocorre a formação de poros e invasão do polímero pela água, resultando em uma aceleração da hidrólise. Cadeias poliméricas que possuem um menor peso molecular tendem a uma cisão de cadeias iniciais que possuem uma maior solubilidade em água, de modo que podem mover-se para o meio aquoso, gerando canais através da matriz. Além disso, pode ocorrer a formação de poros levando a uma perda de massa significativa do polímero, o que leva à uma taxa de degradação mais intensa para o polímero de baixa massa molar (HUTCHINSON e FURR, 1991). No entanto, os polímeros estudados variam somente na massa molar do PEG (5k vs 2k), parte não biodegradável do copolímero em bloco, possuindo bloco PLA de mesma massa molar (20k). Consequentemente a diferença observada por GPC na degradação das cadeias polimérica sugere que a presença de PEG de massa molar mais alta acelera o processo de hidrólise de PEG-PLA nanoestruturado. Este resultado pode estar associado à uma maior hidrofiliidade do polímero em bloco como um todo (PEG_{5k}PLA_{20k}), o que aumenta as chances de hidrólise. As cadeias de PEG de maior tamanho podem estar também emaranhadas no núcleo polimérico das nanoesferas o que facilitaria a penetração de moléculas de água no interior do “core” hidrofóbico da partícula, acelerando a hidrólise.

6.4 Degradação das NP por AF4-DLS-MALS

A técnica de AF4 é utilizada para a caracterização de sistemas coloidais, efetuando a separação de NP com ampla distribuição de tamanho de acordo com o coeficiente de difusão. Seguindo a separação da amostra em frações de tamanho uniforme, essas são caracterizadas por DLS e MALLS para a determinação do raio hidrodinâmico (Rh) e raio de giro (Rg), respectivamente, das NP presentes em cada fração. Dessa forma, é obtida a distribuição real de tamanhos das NP na formulação. Ambas as formulações apresentaram fractogramas parecidos

em 24 h após a incubação em diferentes meios (figura 8 A e B), indicando que as formulações mantiveram sua estabilidade coloidal nos meios de degradação. Os polímeros em sua forma nanoestruturada apresentaram variações em seus tamanhos com o decorrer do período de degradação e dependendo da composição do meio de degradação. Foram obtidos fractogramas para as NS caracterizadas nos três meios de degradação ao longo do estudo de degradação, e, a partir desses, foram determinados os valores médios de distribuição de raios que apresentados na Tabela 03.

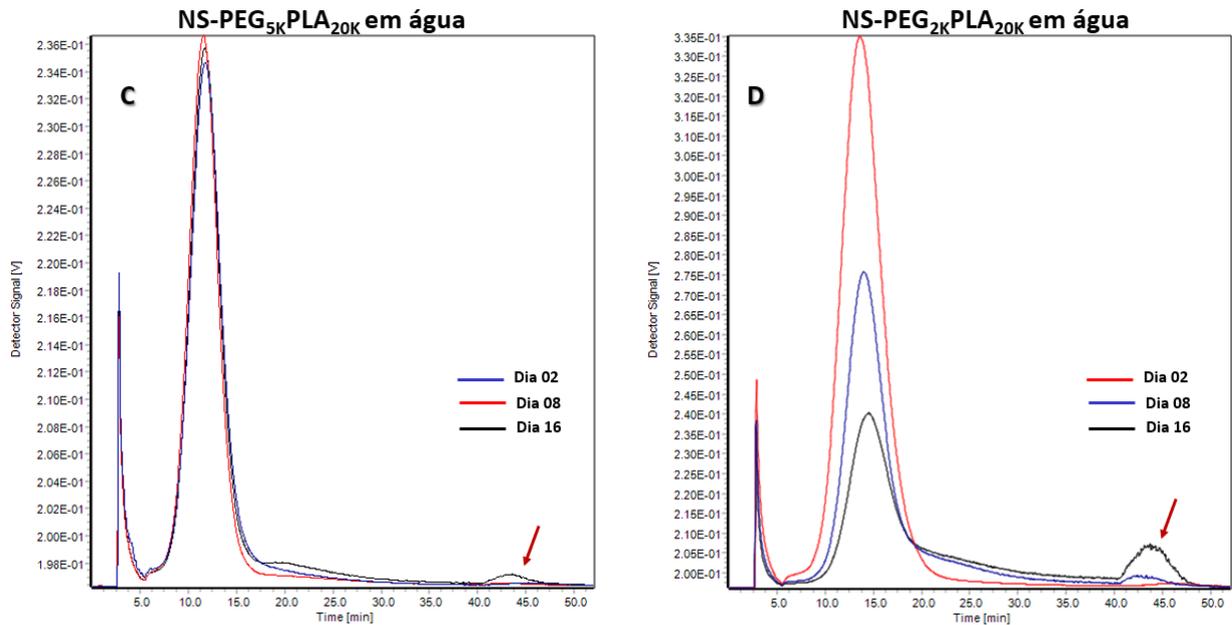
Figura 12: Análises por AF4 das nanoesferas de PEG_{5k}PLA_{20k} (A) e PEG_{2k}PLA_{20k} (B) nos diferentes meios de incubação durante 24h.



6.4.1 Degradação em meio aquoso

A formulação de NS-PEG_{5k}PLA_{20k} apresentou perfis de distribuição parecidos ao longo do tempo, observado pela sobreposição dos picos. No entanto, a amostra analisada no décimo quinto dia apresentou um novo pico, indicado pela seta, o que sugere a formação de agregados (figura 13-C). A formulação de NS-PEG_{2k}PLA_{20k} teve um alargamento em seu pico com o decorrer do período de degradação e também apresentou um novo pico que sugere a formação de agregado, indicado pela seta (figura 13-D), a partir do oitavo dia. Este dado confirma a análise visual macroscópica da amostra onde pode ser observado um precipitado. A área sob os picos, para essa formulação, diminuiu em função do tempo, indicando uma perda de massa, ou uma modificação da composição química da superfície das NP. Contudo, as análises de AF4 mostraram uma maior estabilidade coloidal do PEG_{5k}PLA_{20k} em relação ao PEG_{2k}PLA_{20k}.

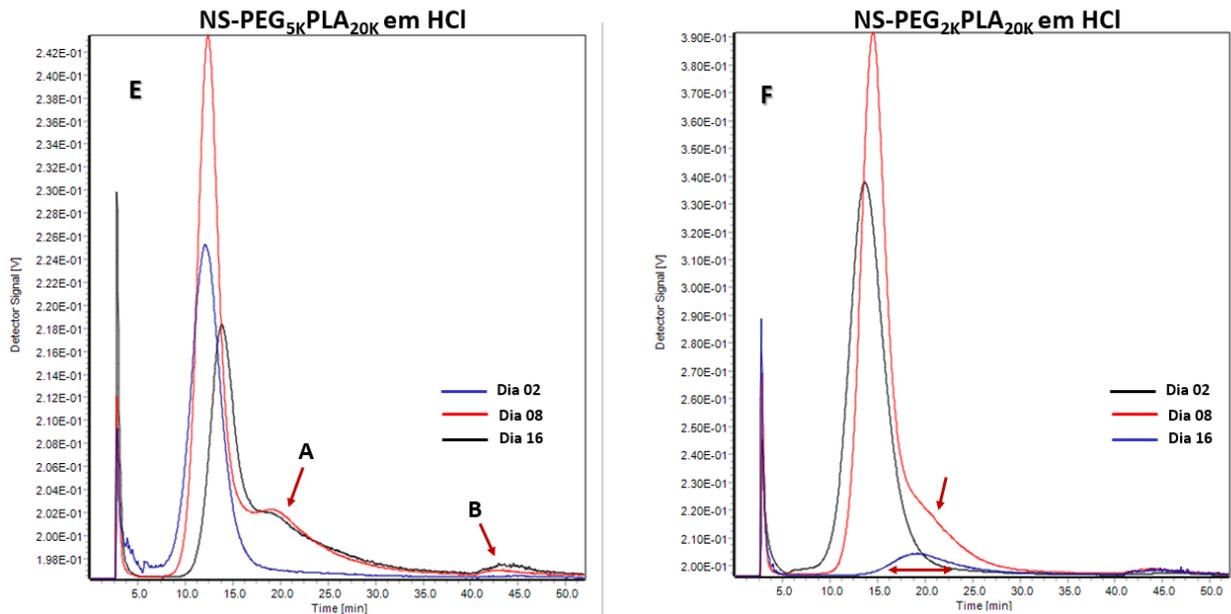
Figura 13: Análises por AF4 das nanoesferas de PEG_{5k}PLA_{20k} (C) e PEG_{2k}PLA_{20k} (D) em meio aquoso.



6.4.2 Degradação em meio ácido

As amostras em HCl apresentaram um alargamento do pico com o decorrer dos dias, indicativo de alteração das estruturas coloidais (figura 14 – E e F). A formulação de NS-PEG_{5k}PLA_{20k} apresentou em seu gráfico um ombro em tempo de retenção maior (seta A na figura 14-E), além de também passar a apresentar um novo pico, indicado pela seta B, sugestivo da formação de agregados com tamanhos maiores. A amostra de NS-PEG_{2k}PLA_{20k} também apresentou um ombro na amostra do oitavo dia e no décimo quinto dia de análise a amostra apresentou uma área sob o pico significativamente menor e mais largo, de acordo com raios das NP significativamente maiores em relação ao tamanho inicial (Tabela 03). Ambas as amostras apresentaram um precipitado indicativo de uma perda de estabilidade coloidal das NP. O aumento do tamanho de partículas foi mais rápido e mais pronunciado em pH 1 em relação ao pH 7, sugerindo que a modificação das estruturas coloidais está relacionada a alterações químicas dos polímeros por degradação hidrolítica, como observado por GPC. Após 15 dias o aumento do tamanho de partículas e perda de matéria foi mais pronunciada para as NP preparadas a partir de PEG_{5k}PLA_{20k} em relação ao PEG_{2k}PLA_{20k}.

Figura 14: Análises por AF4 das nanoesferas de PEG_{5k}PLA_{20k} (E) e PEG_{2k}PLA_{20k} (F) em meio ácido.

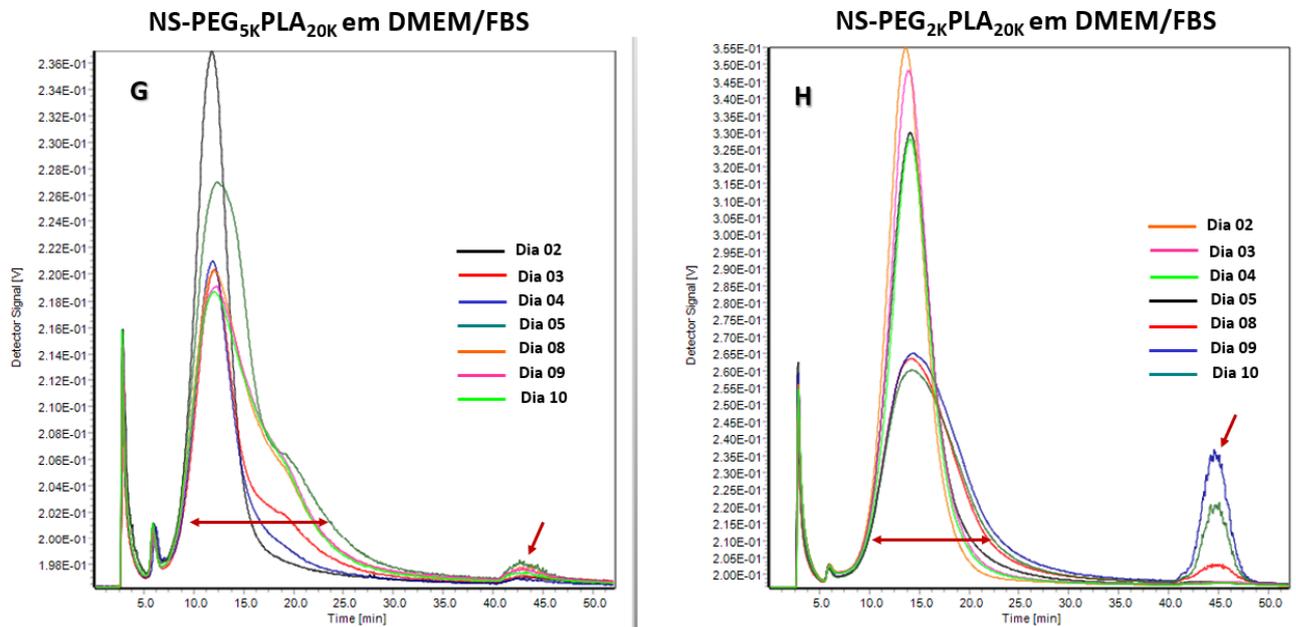


6.3.2 Degradação em meio contendo DMEM/FBS

Devido ao perfil de degradação mais rápido as amostras incubadas em DMEM/FBS também passaram por análises diárias no AF4, assim como nas análises por GPC. Ambas as amostras apresentaram um alargamento do pico no fractograma de AF4 (Figura 15) com o decorrer dos dias, com aumento dos raios médios das NP em relação ao seu tamanho inicial (Tabela 03). Também houve em ambos os gráficos o aparecimento de um novo pico correspondendo a partículas de raio superior a 300nm, sendo este mais evidente na amostra de NS-PEG_{2k}PLA_{20k}. É provável que estas partículas maiores correspondem ao precipitado observado nos tubos Falcon (figura 10). A alta absorção no UV (254nm, resultado não mostrado) sugere a presença de proteínas nesses agregados grandes.

Vale ressaltar que, apesar de ter sido observado um precipitado branco, este representou uma proporção baixa da massa total de polímero presente nas formulações e a sua composição, embora não elucidada, não corresponde ao polímero PEGPLA. Ambas as NP mantiveram o seu tamanho nanométrico durante o estudo de 10 dias em meio DMEM/FBS a 37 °C com aumento moderado do diâmetro médio, apesar de um notável aumento da largura do pico de eluição.

Figura 15: Análise por AF4 em meio DMEM/FBS dos polímeros na sua forma nanoestruturada. PEG_{5k}PLA_{20k} (G) e PEG_{2k}PLA_{20k} (H).



A técnica de AF4-DLS-MALS permitiu a caracterização das formulações, por meio do fracionamento das partículas às suas respectivas detecções por MALLS e DLS, promovendo a separação dos coloides em ampla distribuição de tamanho. Além disso, utilizando esta técnica foi possível obter informações a respeito da forma das partículas presentes na dispersão, através da determinação do fator de forma por meio da relação R_g/R_h entre os raios de giração (R_g), obtidos pelo detector de MALLS, e os raios hidrodinâmicos (R_h), obtidos simultaneamente pelo detector de DLS. Estes dados estão destacados na tabela 02.

Tabela 02 – Evolução dos tamanhos de partículas por AF4 - Estudo de degradação por AF4: raios das NP após incubação nos diversos meios. Determinação em nm do Rh por DLS e do Rg por MALLS.

	Tempo de degradação (dias)																							
	1		2		3		5		8		9		10		15									
Amostra	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	Rg/Rh	Rg	Rh	
SE1 em água	26	16	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	17	0,65	-	-	-	-	-	-	*	17	
SE2 em água	32	23	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	25	0,69	-	-	-	-	-	-	*	27	
SE1 em HCl	28	22	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	18	0,57	-	-	-	-	-	-	*	20	
SE2 em HCl	33	24	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	26	0,62	-	-	-	-	-	-	*	45	
SE1 em FBS	27	19	0,72	26	34	1,31	30	18	0,61	41	26	0,64	28	23	0,82	34	22	0,65	27	21	0,78	-	-	
SE2 em FBS	33	25	0,75	32	27	0,84	36	28	0,78	33	30	0,89	39	27	0,69	*	32	**	35	28	0,81	-	-	

* Os resultados das análises das amostras destes dias específicos foram perdidos devido a um problema desconhecido do aparelho.

** Não foi possível realizar o cálculo, uma vez que não havia o valor de Rh do dia em questão.

Rh: resultados da leitura por DLS de raio hidrodinâmico; Rg: resultados da leitura por MALLS de raio de giração. As amostras em DMEM/FBS foram analisadas somente até o décimo dia de degradação.

Não foram calculados a razão Rg/Rh para o dia 15, uma vez que os valores de Rh destes dias específicos foram perdidos devido a um problema desconhecido do aparelho.

Nesse estudo, foram observadas alterações na distribuição de tamanhos das formulações. As análises por AF4-DLS-MALS indicaram um aumento no tamanho e na distribuição de tamanhos das NP, principalmente das amostras em DMEM/FBS após 72 h de incubação e em HCl pH 1 a partir de 8 dias de incubação, mais pronunciada para NS-PEG_{2k}PLA_{20k} do que para a NS-PEG_{5k}PLA_{20k}. Pequenas variações nos Rg/Rh ao longo do experimento foram observadas, porém os valores não apresentaram padrão de variação estável com o tempo de degradação e se mantiveram na faixa de 0,6 a 0,9, sendo que em um ponto o valor foi de 1,3, característico de estruturas alongadas, mas que não foi verificado no ponto seguinte determinação no tempo). Esses valores estão em torno do valor teórico 0,775 que corresponde ao de esfera maciças, com distribuição homogênea dos pontos de massa na estrutura esférica. As variações observadas para as nanoesferas deste estudo não são conclusivas de mudanças significativas quanto à forma destas partículas.

De acordo com o estudo Jain e colaboradores (2010) inicialmente é observado um aumento no tamanho das nanopartículas, em um período de degradação de 3-4 semanas, podendo indicar a ocorrência de formação de agregados. E, com o decorrer do tempo e envelhecimento das partículas, a tendência é que ocorra uma diminuição em seu tamanho, por perda de massa. Valores extremos de pH favorecem o efeito de aumento de tamanho de partículas, uma vez que, propicia a ocorrência de formação de agregados (BELBELLA *et al*, 1996). Como trata-se de um estudo de degradação forçada com um curto período de tempo (16 dias) onde ainda não havia ocorrido o envelhecimento das formulações, não se observa uma diminuição no tamanho das NP posterior a este aumento.

Vale ressaltar que a degradação química dos polímeros observada por GPC não foi diretamente correlacionada com a perda de estabilidade coloidal das NP. Também, nota-se que o tamanho nanométrico das NS foi mantido em água pH 7 ao longo do estudo (15 dias), em HCl pH 1 por 24 h (sem dados entre os 24 e 192 h), e em meio DMEM/FBS por aproximadamente 5 dias. A estabilidade coloidal de NP é necessária durante estudos de interação com células, sendo que a formação de grandes agregados de NP pode impedir a sua internalização por mecanismos ativos dependente do tamanho (GAUMET, GURNY, DELIE; 2009), ou ao contrario favorecê-la por aumento do contato com as células devido a sua sedimentação (FELIU *et al*; 2017). Consequentemente, esse estudo trouxe informações em relação à duração de estudos *in vitro* com nanoesferas de PEG_{2k}PLA_{20k} e de PEG_{5k}PLA_{20k}.

7. CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de AF4-DLS-MALS combinada com a técnica de GPC foi possível estudar a estabilidade coloidal de NP de polímero biodegradável derivado do PLA em meio aquoso e relacionar variações no tamanho de NP a variações da massa molar do polímero. Uma curva de calibração foi elaborada, o que permitiu quantificar o polímero extraído das suspensões de NS.

As amostras incubadas em DMEM/FBS apresentaram um perfil de degradação em termos de massa molar do polímero e tamanho das partículas mais rápido quando comparadas às amostras em água pH 7 e em HCl pH 1. A diminuição da massa molar dos polímeros, observada através das análises por GPC, pode ser explicada pela hidrólise da cadeia polimérica. As formulações de NS-PEG_{5k}PLA_{20k} apresentaram uma degradação química das cadeias poliméricas mais acentuada que as formulações de NS-PEG_{2k}PLA_{20k}, em todos os meios.

As análises por AF4-DLS-MALS indicaram um aumento no tamanho e na distribuição de tamanhos das NP, principalmente das amostras em DMEM/FBS após 72 h de incubação e em água pH 1 a partir de 8 dias de incubação, mais pronunciada para NS-PEG_{2k}PLA_{20k} do que para a NS-PEG_{5k}PLA_{20k}. Conseqüentemente, é interessante ressaltar que a degradação química dos polímeros não foi diretamente correlacionada com a perda de estabilidade coloidal das NP. Além disso, vale notar que o tamanho nanométrico das NP foi mantido em água pH 7 ao longo do estudo (15 dias), em HCl pH 1 por 24 h (sem dados entre os 24 e 192 h), e em meio DMEM/FBS por aproximadamente 5 dias.

Conhecer o tempo de degradação dos nanocarreadores é fundamental no processo de desenvolvimento de novos fármacos, a partir poliésteres biodegradáveis. Visto que este estudo foi realizado mimetizando o meio biológico, ter informações acerca de quanto tempo uma partícula se mantém estável em meio ácido é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos com administração por via oral, uma vez que possibilita conhecer por quanto tempo um nanocarreador mantém sua estabilidade diante do pH estomacal. Além disso, a estabilidade coloidal da NP é necessária durante estudos de interação com células, sendo que a formação de agregados de NP pode interferir no processo de internalização por mecanismos ativos dependente do tamanho. Dessa forma, conhecer por quanto tempo uma partícula se mantém estável, torna-se imprescindível na realização de estudos *in vivo*.

Contudo, a técnica de AF4-DLS-MALS combinada à técnica de GPC são importantes para estudar a cinética e os mecanismos de degradação de NP, uma vez que fornecem dados complementares que são de grande relevância a avaliação pré-clínica de nanocarreadores poliméricos de fármacos.

REFERÊNCIAS

- AMBROSE, C.G.; CLANTON, T.O. Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. **Annals of Biomedical Engineering**. v.32, p.171-177. 2004.
- AVGOUSTAKIS. K., BELETSI. A., PANAGI. Z., KLEPETSANIS. P., KARYDAS. A.G., ITHAKISSIOS. D.S. PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled Release**. v.79, p.123-135. 2002.
- BELBELLA. A, VAUTHIER. C, FESSI. H, DEVISSAGUET. J-P, PUISIEUX F. In vitro degradation of nanospheres from poly(D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 129, p.95-102. 1996.
- CHENG, X.P.; ZHANG, H.B.; HU, J.J.; FENG, L.F.; GU, X.P. JEAN-PIERRE, C. Characterization of broad molecular weight distribution polyethylene with multi-detection gel permeation chromatography. **Polymer Testing**, v.67, p.213–217. 2018.
- CHU, B. ZHANG, L.; QU, Y.; CHEN, X.; PENG, J.; HUANG, Y.; QIAN, Z. Synthesis, characterization and drug loading property of Monomethoxy Poly(ethylene glycol)-Poly(ϵ -caprolactone)-Poly(D,L-lactide) (MPEG-PCLA) copolymers. **Scientific Reports**. v. 6, p.34069. 2016.
- DAGLA, B.; OZGUR, E.; CORMAN, M. E.; UZUND, L.; DEMIREL, G. B. Polymeric nanocarriers for expected nanomedicine: current challenges and future prospects. **RSC Advances**., v.4, p.48639–48659. 2014
- DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer Vesicles. **Science**, v. 297, p. 967–973. 2002.
- DUNNE, M.; CORRIGAN, O.I.; RAMTOOLA, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. **Biomaterials**. v.21, p.1659-1668. 2000.
- FELIU, N.; SUN, X.; ALVAREZ-PUEBLA, R.A, PARAK, W, J. Quantitative Particle–Cell Interaction: Some Basic Physicochemical Pitfalls. **ACS.Langmuir**. v.33 (27), p. 6639-6646. 2017.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

GAUMET, M., GURNY, R., DELIE, F. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.36, p.465-473. 2009.

HIRSJÄRVI, S. Preparation and Characterization of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles for Pharmaceutical Use. 2008. **Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki**. February, 2008.

HUTCHINSON, F. G.; FURR, B.J.A. Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides. **Journal of Controlled Release**. v.13, p.279-294. 1990.

JAIN, G.K. ; PATHAN, S.A.; AKHTER, S.; AHMAD, N.; JAIN, N.; TALEGAONKAR, S.; KHAR, R.K.; ahmad, F.J. Mechanistic study of hydrolytic erosion and drug release behaviour of PLGA nanoparticles: Influence of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**. v.95: p.2360-2366. 2010.

JOKERST, J. V; LOBOVKINA, T.; ZARE, R. N.; GAMBHIR, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 715–728. 2011.

LI, S.; JOHNSON, J.; PECK, A.; XIE, Q. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 18, 23 dez. 2017.

LIN, W.J.; CHANG, K.L. Degradation of PCL-MPEG diblock copolymer in rat plasma. **Journal of Biomedical Materials Research Part**. v. 85A(3), p. 692-698. 2008.

MELLO, C.G.C, BRANQUINHO, R.T, OLIVEIRA, M.T, MILAGRE, M.M, SAUDE-GUIMARAES, D.A, MOSQUEIRA, V.C. Efficacy of Lychnopholide Polymeric Nanocapsules after Oral and Intravenous Administration in Murine Experimental Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, p.5215-5222. 2016

MUDALIGE, T.; QU, H.; SANCHEZ-POMALES, G.; SISCO, P.N.; LINDER, S.W. Simple Functionalization Strategies for Enhancing Nanoparticle Separation and Recovery with Asymmetric Flow Field Flow Fractionation. **Analytical chemistry**. v.87, p.1764–1772. 2015.

PAULA, M. A. Efeito da variação de dose e das características de superfície de nanocápsulas sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas por via intravenosa. **Universidade Federal de Ouro Preto**. p.103. janeiro, 2016.

POSTNOVA. Field-Flow Fractionation. **Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation**. Disponível em: <<http://www.postnova.com/asymmetric-flow-fff.html>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

POUND-LANA, G.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P.; MOSQUEIRA, V. C. F. Functional polylactide via ring-opening copolymerisation with allyl, benzyl and propargyl glycidyl ethers. **European Polymer Journal**, v. 90, n. March, p. 344–353. 2017.

SAINI, P.; ARORA, M.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 47–59, 2016.

TROPNER, O. Gel permeation chromatography (GPC). **SKZ: Das Kunststoff-Zentrum**. Disponível em: <<http://www.skz.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4873.Gel-permeation-chromatography--GPC.html>>. Acesso em: 15 Out. 2018.

VERT, M. Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. **Biomacromolecules**. v. 6, p. 538-546.2005.

WANG, K.; ZHANG, Y.; WANG, J.; YUAN, A.; SUN, M.; WU, J.; HU, Y. Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27421, 2016.