

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Campus Poços de Caldas

ANDREIA DE CARVALHO PADILHA

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES DE
QUITOSANA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Poços de Caldas/MG
2019

ANDREIA DE CARVALHO PADILHA

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES DE
QUITOSANA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Alfenas *campus* Poços de Caldas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos.

Co-orientador: Dr. Marcelo Gonçalves Vivas.

Poços de Caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

P123o Padilha, Andreia de Carvalho.

Obtenção de nanopartículas fluorescentes de quitosana para potencial aplicação biomédica / Andreia de Carvalho Padilha. -- Poços de Caldas/MG, 2019.

73 f. --

Orientador(a): Maria Gabriela Nogueira Campos.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.
Bibliografia.

1. Quitosana. 2. Fluorescência. 3. Metotrexato. I. Campos, Maria Gabriela Nogueira. II. Título.

CDD – 620.11

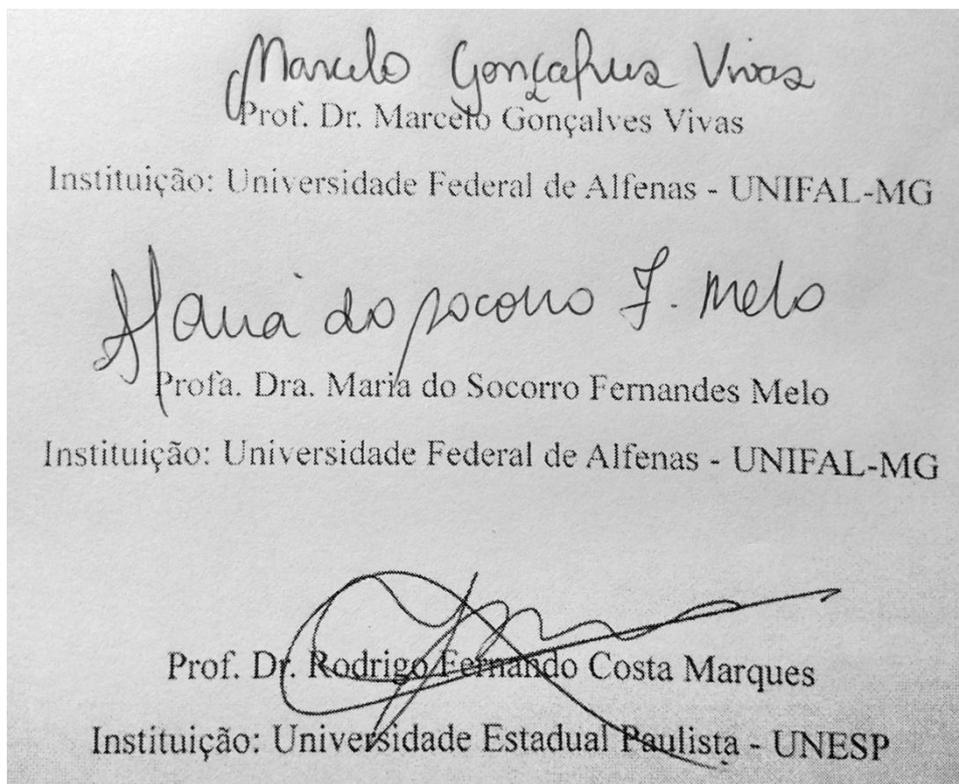
ANDREIA DE CARVALHO PADILHA

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES DE QUITOSANA PARA
POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração:
Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 28 de Fevereiro de 2019.



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por me guiar e guardar durante esta caminhada.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos. Tenho profunda admiração pela sua conduta profissional, paciência e sabedoria. Agradeço pela oportunidade concedida, e por, mesmo de longe, ser tão solícita e receptiva.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Vivas, que gentilmente aceitou o convite para colaborar neste trabalho. Seus ensinamentos, disponibilidade e incentivos foram indispensáveis. Admiro sua competência e modo de ensinar.

Às minhas inspirações de vida, meus pais Vera e Silvano e meu irmão Ricardo, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para os meus estudos.

Ao Guilherme, pelo amor e verdadeiro companheirismo. Muito obrigada por estar ao meu lado em mais uma etapa da minha vida.

Aos amigos, pela torcida para que tudo desse certo.

À colega de laboratório e professora Dra. Maria do Socorro. Obrigada pelas conversas, paciência e ensinamentos desde o primeiro dia que iniciei minhas atividades no laboratório.

Às meninas do laboratório de Alfenas, pelo suporte nas análises de DLS e disponibilização de equipamentos.

Aos professores, Dra. Tânia, Dr. Gael e Dra. Tatiana, que gentilmente disponibilizaram equipamentos de seus laboratórios.

À técnica Lucélia do LRAC – FEQ – Unicamp pelas análises por MEV.

À Mayara, da secretaria do PPGCEM, pela disponibilidade.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

À CAPES pelo apoio na realização deste trabalho.

Por fim, expresso meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A tecnologia de bioimagens aliada à nanomedicina é um campo de grande demanda no desenvolvimento de materiais que não necessitem de técnicas invasivas e que apresentem propriedades que permitam à sua aplicação biológica. A quitosana (Q) é um biopolímero que apresenta aplicações biomédicas interessantes devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Em contrapartida, sua baixa eficiência quântica de fluorescência natural limita sua utilização na área de bioimagem. Neste contexto, este trabalho teve como foco o estudo da fluorescência de nanopartículas de quitosana obtidas através de tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas e tempos de exposição utilizando ácido clorídrico (HCl), ácido cítrico (AC) e ácido acético (AAc) como solventes. Posteriormente, às nanopartículas de Q-HCl foi incorporado o fármaco metotrexato (MTX). As partículas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), distribuição de tamanhos de partícula pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e carga de superfície (potencial Zeta). No estudo das propriedades fotoluminescentes das partículas de quitosana, estas foram caracterizadas por espectroscopia de UV-visível, por espectroscopia de fluorescência e quanto à eficiência quântica. Já com as nanopartículas incorporadas com MTX foi avaliada a eficiência de incorporação do fármaco. As sínteses com HCl e AC foram efetivas na formação de nanopartículas, comprovadas pela análise de DLS. Os espectros de FTIR demonstraram que a estrutura característica da quitosana foi mantida e que houve interação com o ácido. Os espectros de UV-visível e de fluorescência para Q-HCl e Q-AAc mostraram que a diminuição do tamanho das nanopartículas é acompanhada de uma mudança no formato e intensidade das bandas de absorção, excitação e emissão. O aumento da intensidade fluorescente foi comprovado pela determinação da eficiência quântica das partículas, evidenciando que o tratamento hidrotérmico potencializa suas propriedades fotoluminescentes, apresentando um aumento de 75 vezes para as NPs Q-HCl sintetizadas nas condições de 150°C por 120 minutos. Através da análise térmica foi observado que a incorporação do MTX proporcionou uma melhora na estabilidade térmica das nanopartículas. Por fim, a análise morfológica por MEV mostrou correlação com os diâmetros médios obtidos por DLS, demonstrou o formato esférico das nanopartículas de Q-HCl e Q-AC, bem como o aumento dos tamanhos das nanopartículas de quitosana após incorporação do MTX. A interação entre fármaco e quitosana também foi observada nos espectros de FTIR e a incorporação de MTX às NPs Q-HCl foi de 72,9%, acompanhado de alteração nos formatos das nanopartículas.

Palavras-chave: Quitosana. Fluorescência. Tratamento hidrotérmico. Eficiência Quântica. Metotrexato.

ABSTRACT

The bioimaging technology allied to nanomedicine is a field of great demand on developing materials that do not require invasive techniques and which present properties that allow their biological application. Chitosan is a biopolymer that presents interesting biomedical applications due to its biocompatibility, biodegradability and low toxicity. In contrast, its low quantum natural yield limits its use in the bioimaging area. In this context, this work focused on the fluorescence study of chitosan nanoparticles obtained by hydrothermal treatment at different temperatures and exposure times using hydrochloric acid, citric acid and acetic acid as solvents. Subsequently, the drug methotrexate (MTX) was incorporated into the Q-HCl nanoparticles. The particles were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), particle size distribution by dynamic light scattering (DLS) and surface charge (Zeta potential). In the study of the photoluminescent properties of the chitosan particles, these were characterized by UV-visible spectroscopy, fluorescence spectroscopy and quantum yield. In addition, with the nanoparticles incorporated with MTX the efficiency of incorporation of the drug was evaluated. The synthesis with hydrochloric acid and citric acid were effective in the formation of nanoparticles, as evidenced by DLS analysis. The FTIR spectra demonstrated that the chitosan characteristic structure was maintained and that there was interaction with the acid. UV-visible and fluorescence spectra for chitosan-hydrochloric acid and chitosan-acetic acid showed that the decrease in nanoparticle size is accompanied by a change in the fluorescence intensity of the absorption, excitation and emission bands. The increase in fluorescence intensity was confirmed by the determination of the quantum yield of the particles, evidencing that the hydrothermal treatment potentiates its photoluminescent properties, presenting a 75-fold increase for the chitosan-hydrochloric acid nanoparticles synthesized at the conditions of 150°C for 120 minutes. Through thermal analysis it was observed that the incorporation of MTX provided an improvement in the thermal stability of the nanoparticles. Finally, the morphological analysis by SEM showed a correlation with the mean diameters obtained by DLS, demonstrated the spherical shape of the chitosan-hydrochloric acid and chitosan-citric acid nanoparticles, as well as the increase in size of chitosan nanoparticles after incorporation of MTX. The interaction between drug and chitosan was also observed in the FTIR spectra and the incorporation of MTX to the chitosan-hydrochloric acid nanoparticles was 72.9%, accompanied by changes in the nanoparticle formats.

Keywords: Chitosan. Fluorescence. Hydrothermal treatment. Quantum yield. Methotrexate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica da quitosana.....	15
Figura 2 - Mecanismo de hidrólise catalisada por ácido.....	18
Figura 3 - Estruturas dos ácidos orgânicos (a) ácido acético e (b) ácido cítrico.....	18
Figura 4 - Diagrama de Jablonski simplificado.....	20
Figura 5 - Células marcadas com Q-TPE-TPP, (BF) campo brilhante e (F) fluorescência. Barra de escala de 50 microns.....	23
Figura 6 - Representação dos tipos de nanocarreadores.....	24
Figura 7 - Estrutura molecular do (a) metotrexato e (b) ácido fólico.....	27
Figura 8 – Representação esquemática da síntese de nanopartículas de quitosana.....	30
Figura 9 - Amostras de Q-HCl tratadas hidrotermicamente a 180°C por (a) 60, (b) 90 e (c) 120 minutos.....	37
Figura 10 - Espectros FTIR. A: quitosana e NPs de Q-HCl; B: quitosana, AC e NPs de Q-AC e C: quitosana, AAc e NPs de Q-AAc.....	38
Figura 11 - Espectros UV-Vis da quitosana solubilizada (concentração de ~ 5 mg/ml) e das nanopartículas (concentração de ~ 1 mg/ml). A: Síntese com ácido clorídrico; B: Síntese com ácido cítrico e C: Síntese com ácido acético.....	42
Figura 12 - Espectros de excitação e emissão de Q-HCl. (A) quitosana solubilizada em HCl (~5 mg/ml); (B) NPs Q-HCl 150°C 120' (~1 mg/ml); (C) NPs Q-HCl 180°C 90' (~1 mg/ml). (D) Sobreposição dos espectros das maiores intensidades de emissão.	44
Figura 13 - Espectros de excitação e emissão de Q-AC. (A) quitosana solubilizada em AC (~5 mg/ml); (B) NPs Q-AC 150°C 120' (~1 mg/ml); (C) NPs Q-AC 180°C 90' (~1 mg/ml). (D) Sobreposição dos espectros das maiores intensidades de emissão.	45
Figura 14 - Espectros de excitação e emissão de Q-AAc. (A) quitosana solubilizada em AAc (~5 mg/ml); (B) NPs Q-AAc 150°C 120' (~1 mg/ml); (C) NPs Q-AAc 180°C 90' (~1 mg/ml). (D) Sobreposição dos espectros das maiores intensidades de emissão.	46
Figura 15 - Gráfico TG da quitosana em pó e das nanopartículas.....	48
Figura 16 - Gráfico DSC da quitosana em pó e das nanopartículas.....	50
Figura 17 - MEV das nanopartículas de Q-HCl.....	51
Figura 18 - MEV das nanopartículas de Q-AC.....	52
Figura 19 - MEV das nanopartículas de Q-AAc.....	53
Figura 20 - Espectro de varredura UV-Vis do MTX (0,1 mg/ml).....	54
Figura 21 - Espectros FTIR de Q-HCl, MTX e Q-MTX.....	55

Figura 22 - Gráfico TG das nanopartículas de quitosana e das nanopartículas incorporadas com MTX.....	57
Figura 23 - Gráfico DSC das nanopartículas de quitosana e das nanopartículas incorporadas com MTX.....	58
Figura 24 - MEV das nanopartículas de Q-MTX.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de tratamento hidrotérmico empregadas para os ácidos.....	30
Tabela 2 - Tamanho médio e índice de polidispersividade (PDI) das partículas.	36
Tabela 3 – Principais bandas identificadas nos espectros de FTIR e seus respectivos grupos funcionais.	40
Tabela 4 - Tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial Zeta das partículas liofilizadas.	40
Tabela 5 - Eficiência quântica.	47
Tabela 6 - Principais bandas identificadas nos espectros de FTIR e seus respectivos grupos funcionais.	56

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AAc	– Ácido acético
AC	– Ácido cítrico
DSC	– Calorimetria exploratória diferencial
FTIR	– Infravermelho com transformada de Fourier
GD	– Grau de desacetilação
K_{ic}	– Conversão interna
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
MTX	– Metotrexato
NP	– Nanopartícula
PDI	– Índice de polidispersividade
Q	– Quitosana
Rpm	– Rotações por minuto
TG	– Análise Termogravimétrica
TH	– Tratamento hidrotérmico
ϕ	– Eficiência quântica
2-AMP	– 2-aminopiridina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	QUITOSANA	14
2.2	MÉTODOS DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	16
2.3	ABSORÇÃO ÓPTICA E FOTOLUMINESCÊNCIA	19
2.4	SONDAS FLUORESCENTES	22
2.5	SISTEMAS CARREADORES E DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	23
2.6	METOTREXATO	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	GERAL.....	28
3.2	ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAS E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAIS.....	29
4.2	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	29
4.2.1	Preparo das nanopartículas	29
4.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	31
4.2.3	Diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta	31
4.2.4	Espectroscopia de absorção UV-Visível	32
4.2.5	Espectroscopia de fluorescência	32
4.2.5.1	Eficiência quântica de fluorescência.....	32
4.2.6	Análise Térmica	33
4.2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.2.8	Incorporação do metotrexato às nanopartículas	34
4.2.9	Análise quantitativa do MTX	34
4.2.9.1	Seleção do comprimento de onda representante do MTX	34
4.2.9.2	Determinação da curva padrão do MTX.....	34
4.2.9.3	Avaliação da eficiência de incorporação	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	TRIAGEM	36
5.1.1	Diâmetro hidrodinâmico	36
5.3	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)	37
5.4	DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA.....	40

5.6	ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	42
5.7	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	43
5.7.1	Eficiência Quântica de Fluorescência	47
5.8	ANÁLISE TÉRMICA.....	48
5.8.1	Termogravimetria (TG)	48
5.8.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	50
5.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	50
5.10	COMPRIMENTO DE ONDA REPRESENTANTE DO MTX	53
5.10	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%).....	54
5.11	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS NPs Q-MTX.....	54
5.12	DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA DAS NPS Q-MTX	56
5.13	ANÁLISE TÉRMICA DAS NPS Q-MTX.....	57
5.13.1	Termogravimetria (TG)	57
5.13.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	58
5.14	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS NPs Q-MTX.....	59
6	CONCLUSÕES	60
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da nanotecnologia, segmento de manipulação e produção de materiais em dimensões nanométricas, aliado à biotecnologia tem proporcionado uma gama de possibilidades para aplicações e investigações biológicas. As principais vantagens que tornam a nanotecnologia uma área extremamente promissora são a semelhança na escala de tamanhos entre nanopartículas e biomoléculas, e, principalmente, as propriedades das nanopartículas, que podem ser consideravelmente modificadas com relação às propriedades apresentadas pelo mesmo material em estado macro (*bulk*) (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; FEYNMAN, 1960).

A tecnologia de imagens representa uma técnica promissora para a área de bioimagens, pois auxilia no diagnóstico e tratamento de doenças de forma não invasiva (KIM et al., 2009).

Exemplos relevantes estudados devido às propriedades fotoluminescentes são os quantum dots, materiais nanométricos que apresentam efeitos de confinamento quântico, e os carbon dots, que possuem propriedades luminescentes associadas a defeitos de superfície (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; RODUNER, 2006). Contudo, a aplicação destes materiais na área biomédica requer sua funcionalização ou recobrimento, devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso e alta capacidade de geração de respostas imunológicas (SONG et al., 2012).

A síntese de sondas fluorescentes comumente utiliza a funcionalização por biomoléculas para aplicação em diagnósticos médicos e obtenção de bioimagens. No entanto, polímeros fluorescentes, que não necessitam da associação de fluoróforos, tem despertado grande interesse devido à excelente biocompatibilidade que apresentam (YAN et al., 2015).

A quitosana é o polissacarídeo mais investigado em aplicações biomédicas. Este polímero natural é derivado da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. O interesse no estudo da quitosana, não se baseia apenas no fato de ser um produto renovável, mas principalmente por propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, além de apresentar mucoadesão, propriedades que justificam seu emprego como biomaterial (SHUKLA et al., 2013). Em escala macro, a quitosana é insolúvel em água, solubilizando-se

apenas em condições ácidas. Em contrapartida, nanopartículas de quitosana apresentam dispersão em água, o que amplia sua aplicação como biomaterial.

Aliado às propriedades apresentadas pela quitosana, nanopartículas poliméricas apresentam vasta aplicação como agentes carreadores de fármacos. Nanocarreadores em geral proporcionam proteção contra degradação do fármaco, melhoram sua absorção facilitando a difusão pelo epitélio, podendo ainda melhorar a penetração intracelular. Outra vantagem da aplicação de nanosistemas é que podem proporcionar melhoras na performance de obtenção de imagens biológicas associado ao efeito terapêutico da droga (ERINKI et al., 2015; WU et al., 2009).

O metotrexato (MTX) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de câncer. Todavia, este fármaco apresenta alguns obstáculos observados através de estudos clínicos que demonstram um efeito limitado do MTX relacionado à doses tóxicas, provocando efeitos colaterais, e à resistência da droga na célula tumoral. Estudos de sistemas carreadores para o MTX demonstraram contornar esta situação, melhorando sua solubilidade, estabilidade e biodistribuição (TRAN et al., 2013).

O emprego da quitosana como biossensor está vinculado à reação com moléculas fluorescentes que podem ser tóxicas para as células ou podem se desgastar rapidamente (JIAYIN; JIANMIN, 2006). A quitosana natural apresenta baixa intensidade fluorescente, no entanto, recentemente foi reportado na literatura o aumento desta intensidade após aquecimento, bem como a formação de pequenas partículas após aquecimento prolongado (BASUMALLICK et al., 2016; YANG et al., 2012). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar nanopartículas de quitosana obtidas através de tratamento hidrotérmico para potencial aplicação biomédica, bem como avaliar a incorporação do fármaco MTX nas nanopartículas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

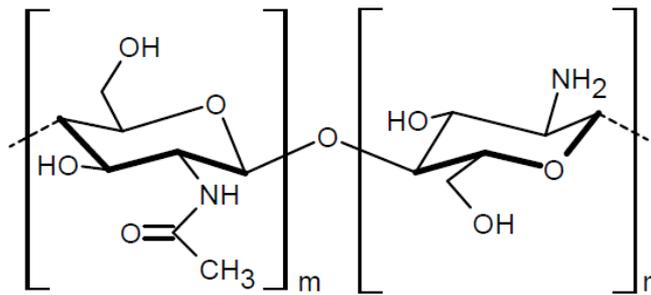
2.1 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear que pode ser encontrado em fungos, como na parede celular do *Mucorales*, mas é comumente obtida através da desacetilação da quitina, componente que corresponde de 15 a 40% da carapaça de caranguejos e camarões. A carapaça desses crustáceos é descartada pela indústria pesqueira por se tratar de uma parte não comestível. Desta forma, a obtenção da quitosana utiliza matéria-prima originada de rejeitos de pesca, contribuindo para sua viabilidade econômica e sustentável (GOMES; PASCHOALIN; AGUILA, 2017; KUMAR, 2000).

A desacetilação da quitina pode ser conduzida por processos químicos ou enzimáticos. O processo químico é o mais utilizado e ocorre em soluções de hidróxido de sódio ou potássio 40%-60% a 120°C por 1-3 horas (AZEVEDO et al., 2007). Já o processo enzimático, por apresentar elevado custo para extração de desacetilases, têm seu emprego limitado em escala industrial (ARANAZ et al., 2009).

Quitina e quitosana são constituídas por unidades 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1,4)$, sendo que suas estruturas se diferem quanto à proporção relativa dessas unidades (AZEVEDO et al., 2007). A Figura 1 representa a estrutura molecular desses biopolímeros, cujas unidades 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopirranose predominam na quitina ($m < n$), insolúvel na maioria dos solventes, e, em contrapartida, a quitosana é formada predominantemente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose ($m > n$) e apresenta solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos. Desta forma, a quitosana pode apresentar diferentes graus médios de desacetilação (\overline{GD}) por hidrólise dos grupos acetamino, e, conseqüentemente, massas moleculares variadas. A desacetilação completa da quitosana envolve muitas reações e é raramente alcançada, desta forma, o \overline{GD} da quitosana comercial varia entre 70 a 95% (FONSECA, 2016).

Figura 1 - Estrutura básica da quitosana.



Fonte: Da autora.

Há três grupos funcionais reativos presentes na quitosana: dois grupos hidroxila e um grupo amino, tendo este último importante relação com a sua solubilidade (DIAS, 2013). Insolúvel em água, em pH neutro e alcalino, a quitosana pode ser dispersa apenas em soluções ácidas diluídas ($\text{pH} < 6$), devido à protonação dos grupos amino (NH_3^+), que são ácidos fracos (pK_a entre 6,2 - 7,0). Contudo, este polissacarídeo solúvel carregado positivamente, forma sais com ácidos orgânicos e inorgânicos (AZEVEDO et al., 2007; HEJAZI; AMIJI, 2003; ILLUM, 1998). Sua solubilidade depende de vários fatores, como: \overline{GD} , concentração, massa molar, do tipo de ácido e do pH do meio, incluindo ainda a distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal (BOF et al., 2015; CHEN et al., 2007; FONSECA, 2016).

O alto grau de desacetilação faz com que a cadeia da quitosana fique expandida em solução aquosa, devido à repulsão entre cargas. Conseqüentemente, além do \overline{GD} influenciar na conformação, também exerce relação com outra propriedade, a viscosidade da solução. Se \overline{GD} é baixo, as moléculas tendem a ficar mais enoveladas, devido à baixa densidade de cargas, diminuindo a viscosidade (ERRINGTON et al., 1993; TAVARES, 2011).

A insolubilidade da quitosana em meios neutros, como dito anteriormente, limita sua utilização em muitas aplicações biológicas, porque é sob estas condições que a maior parte das enzimas fisiológicas exibe máxima atividade (CAMPANA FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007). Por isso, se torna conveniente a realização de reações que façam da quitosana, ou de seus derivados, solúveis em ampla faixa de pH (BASUMALLICK et al., 2016). Neste caso, modificações químicas e/ou despolimerização da cadeia polimérica são uma das alternativas para melhorar a solubilidade da quitosana (RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993).

A quitosana pode ser degradada por enzimas hidrolíticas, reduzindo sua massa molar em contato com o ambiente corpóreo. Além disso, apresenta biocompatibilidade, propriedade de extrema importância para aplicações em seres vivos (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). Baixa toxicidade, potencial para formação de complexos com polieletrólitos aniônicos e a possibilidade de processamento na forma de géis, membranas, nanofibras, esponjas, micropartículas e nanopartículas se destacam ainda dentre suas propriedades, que tornam a quitosana um material muito funcional para o emprego como biomaterial (JAYAKUMAR et al., 2010).

Dentre as aplicações biomédicas de maior evidência da quitosana estão: cicatrização de feridas (SUH; MATTHEW, 2000) e tratamento de queimaduras (GIRATA et al., 2011); excipiente na distribuição de fármacos (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010) e de gene (ERBACHER et al., 1998; ROY et al., 1999); e implantes dentários (AZEVEDO et al., 2007).

2.2 MÉTODOS DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Os processos mais comuns e bem estabelecidos utilizados na preparação de nanopartículas de quitosana são gelificação iônica, sistemas de microemulsão, emulsificação-evaporação de solvente e complexação polieletrólítica (JOHN et al., 2017; TIYABOONCHAI, 2003). Recentemente relatada, outra metodologia de síntese de nanopartículas de quitosana consiste no tratamento hidrotérmico. Cada metodologia permite a obtenção de diferentes tamanhos de partículas, considerando ainda particularidades como estabilidade do produto final e reprodutibilidade do método (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

Os métodos de gelificação iônica e de complexação polieletrólítica são os de mais simples preparação e não utilizam solventes orgânicos perigosos. Na gelificação iônica, basicamente ocorre interação eletrostática entre os grupos amino protonados da quitosana e grupos de carga negativa de um poliânion (reticulante) formando um gel, que, sob agitação, formam nanopartículas espontaneamente que podem ser separadas por centrifugação (CALVO et al., 1997; TIYABOONCHAI, 2003). A complexação eletrolítica também se baseia na interação eletrostática,

porém entre biopolímeros de cargas opostas, normalmente possuidores de grupos carboxílico e amino (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010).

Em contraste, os métodos de microemulsão e emulsificação-evaporação de solvente apresentam maior complexidade e mais etapas de preparação. Também chamado de micela inversa, o sistema de microemulsão água em óleo fundamenta-se na formação de nanopartículas no núcleo aquoso de micelas invertidas. Neste método, uma solução de ácido acético, quitosana e glutaraldeído são adicionados a uma mistura de tenso ativo e N-hexano sob agitação. Posteriormente, o solvente orgânico é evaporado em baixa pressão, o surfactante é removido por precipitação, e as nanopartículas são dializadas e liofilizadas. Uma vantagem é que as micelas confinam e limitam o crescimento das nanopartículas, o que possibilita a obtenção de tamanhos menores que 100 nm (MITRA et al., 2001; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010).

Já na emulsificação-evaporação de solvente, utiliza-se uma emulsão óleo em água. Desta forma, uma solução de polímero dissolvido em solvente orgânico volátil é emulsificada em uma solução aquosa de tensoativo. Em sequência, o solvente é evaporado, levando à diminuição da solubilidade do polímero e, conseqüente, à formação de nanopartículas (EL-SHABOURI, 2002; TIYABOONCHAI, 2003).

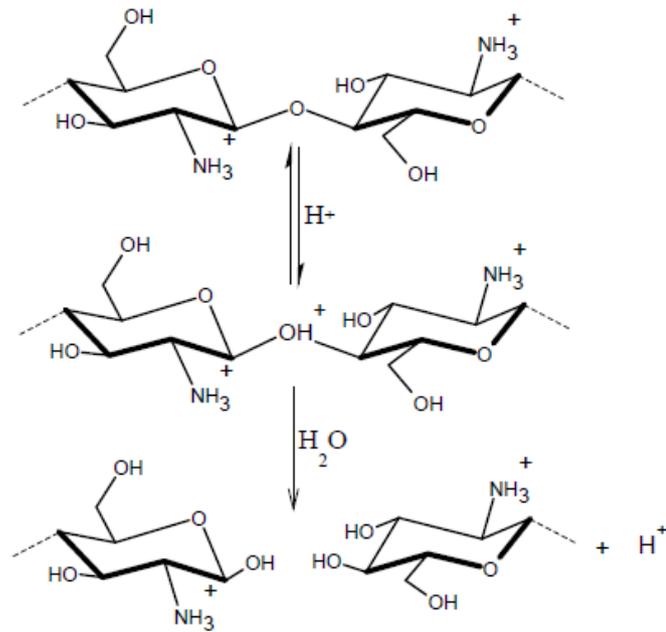
A síntese hidrotérmica compreende reações químicas que ocorrem em um sistema fechado na presença de solvente aquoso (BYRAPPA; ADSCHIRI, 2007). Este tipo de síntese é menos explorado para a obtenção de nanopartículas de quitosana, mas apresenta fácil reprodutibilidade e não utiliza solvente orgânico.

A metodologia empregada se baseia na despolimerização do polímero, processo que pode ocorrer via agentes físicos (calor, pressão, radiação) e por agentes químicos (ácidos, bases, enzimas) (CHOI et al., 2002; HARISH PRASHANTH; THARANATHAN, 2005; JIA; SHEN, 2002; QIN et al., 2004; TOMMERAAS et al., 2001). A despolimerização, além de melhorar a solubilidade da quitosana, diminui o tamanho das partículas do polímero pela redução das cadeias polissacarídeas (HUANG et al., 2013; JIA; SHEN, 2002; SHIN-YA et al., 2001).

Na Figura 2 está representado o mecanismo de hidrólise ácida. Neste processo, os ácidos entram como aceleradores da hidrólise das ligações glicosídicas, fornecendo íons H^+ que catalisam a reação. Além disso, a associação de temperatura e pressão no procedimento de síntese tende a acelerar ainda mais o

processo de despolimerização (BASUMALLICK et al., 2016; HUANG et al., 2013; SHEN, 2002).

Figura 2 - Mecanismo de hidrólise catalisada por ácido.

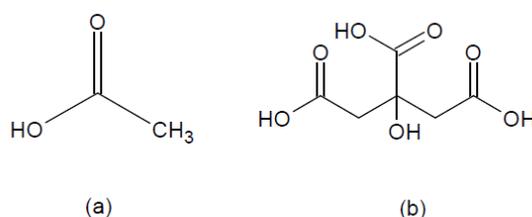


Fonte: Adaptado de BRAUN; DORGAN (2009), VARUM; OTTOY; SMIDSRØD (2001).

Os ácidos acético e cítrico são ácidos amplamente utilizados na indústria médica e alimentícia (CHEN et al., 2007). Estes ácidos servem como fornecedores de prótons em solução, solubilizando a quitosana, e, neste caso, entram também como agentes despolimerizantes (ROMANAZZI et al., 2009).

Na Figura 3 estão representados os ácidos orgânicos utilizados neste trabalho. O ácido acético ($C_2H_4O_2$) apresenta um grupo carboxílico, representando assim um monoácido, cujo $pK_a=4,8$. Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) também é um ácido carboxílico, no entanto apresenta três grupamentos carboxila, caracterizando-se por um ácido terciário, e que apresenta pK_a 3,08 (CLAYDEN et al., 2001).

Figura 3 - Estruturas dos ácidos orgânicos (a) ácido acético e (b) ácido cítrico.



Fonte: Da autora.

2.3 ABSORÇÃO ÓPTICA E FOTOLUMINESCÊNCIA

A absorção de luz (fótons) por uma molécula é um processo óptico no qual um elétron é transferido do estado fundamental para um estado de mais alta energia, conhecido como estado excitado. Segundo o princípio de exclusão de Pauli, no estado fundamental de uma molécula, os elétrons ocupam os orbitais σ , π , ou n , os chamados orbitais ligantes, e, o último destes orbitais moleculares preenchidos recebe a denominação HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*. Durante a transição eletrônica, elétrons são promovidos para o primeiro orbital molecular vazio, denominado LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, que compreende um dos orbitais antiligantes σ^* e π^* (VAZ et al., 2015).

As transições entre os orbitais moleculares apresentam diferentes energias, por conseguinte, as absorções de maior energia são mais difíceis e menos prováveis de ocorrer (VALEUR, 2001). A energia necessária para estas transições normalmente segue a ordem: $n \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \pi \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$.

A absorção de luz por uma amostra é seguida pela lei de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = c \cdot \varepsilon_\lambda \cdot l; \quad (1)$$

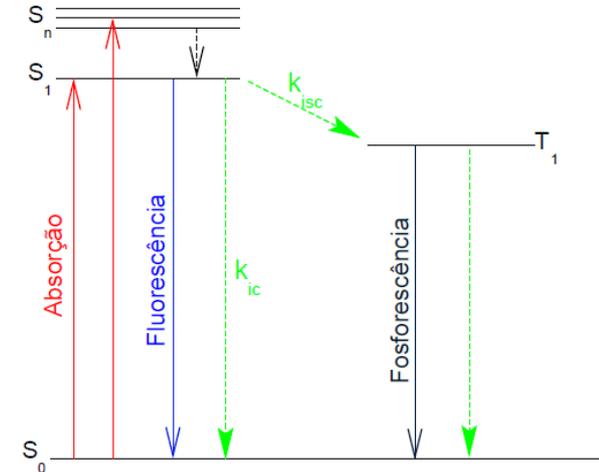
em que I_0 é a intensidade incidente, I é a intensidade transmitida, ε_λ é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c é a concentração da espécie absorvedora ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), l é o comprimento óptico (PAVIA et al., 2010).

Os mecanismos de emissão de luz são descritos como processos luminescentes, caracterizando-se pela emissão de fótons por um intervalo de tempo (SKOOG et al., 2006; VAZ et al., 2015). Uma vez que a espécie é excitada, a energia absorvida é dissipada pela emissão de radiação, podendo se caracterizar por fluorescência ou fosforescência. Na primeira, a emissão de luz compreende a duração da excitação, e, na segunda, a emissão de luz permanece por mais um tempo após a retirada da excitação (LAKOWICZ, 1999).

Este processo de absorção e emissão de luz é ilustrado pelo diagrama de Jablonski, Figura 4. Nele está representado o estado eletrônico fundamental singlete (S_0), os estados singletos excitados (S_1 , $S_{2...}$) e estado tripleto excitado (T_1). São os

estados singletos e tripletos que caracterizam os processos fotoluminescentes: fluorescência e fosforescência.

Figura 4 - Diagrama de Jablonski simplificado.



Fonte: Da autora.

Na emissão fluorescente, a transição $S_1 \rightarrow S_0$ (estados singletos) possui elétrons excitados com *spins* de orientações iguais aos do estado fundamental, desta forma, retornar à S_0 é permitido e ocorre rapidamente (da ordem de 10^{-9} a 10^{-7} segundos). Em contrapartida, quando os elétrons excitados se encontram com orientação de *spin* diferentes do estado fundamental, o retorno a S_0 se torna uma transição proibida, resultando em uma taxa de emissão mais lenta, prolongando o tempo de emissão (da ordem de 10^{-3} a 100 segundos), que caracteriza a fosforescência (LAKOWICZ, 1999). Neste trabalho, a fosforescência não apresenta aplicação prática, portanto, apenas fluorescência será posteriormente abordada.

Segundo a regra de Kasha, antes de retornar ao estado fundamental emitindo fótons, os elétrons decaem para o nível excitado de menor energia (fundo da banda do estado excitado), dissipando a energia excedente através de vibrações (LAKOWICZ, 1999). A energia do fóton é definida pela equação de Planck (PLANCK, 1901):

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}; \quad (2)$$

em que E é a energia dada em Joules, h é a constante de Planck (J.s), ν é a frequência (s^{-1}), λ é o comprimento de onda do fóton (m) e c é a velocidade da luz

(m.s⁻¹). Como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda, a diminuição da mesma faz com que a emissão fluorescente ocorra em maiores comprimentos de onda do que o da absorção. Esta lei se encontra intimamente relacionada ao chamado deslocamento de Stokes, que consiste na observação de diferentes comprimentos de onda para a absorção e a emissão de luz (LAKOWICZ, 1999).

Embora a emissão de luz seja um fenômeno observável aos olhos, nem todos os elétrons dos grupos excitados das moléculas retornam ao estado fundamental emitindo radiação. Ou seja, a energia excedente também pode ser liberada de forma não radiativa, em que a espécie excitada sofre desativação por conversão interna, K_{ic} , que se caracteriza pela transferência de energia entre moléculas que se chocam no sistema, liberando energia térmica.

Os mecanismos radiativos e não radiativos competem entre si, e, devido a esta concorrência, a determinação do fator que correlaciona desativação e emissão fluorescente se torna extremamente importante no estudo da fluorescência de um material. Assim sendo, a eficiência quântica de fluorescência (Φ) é representada pela razão expressa na Equação 3, e seu valor máximo é 1. Na prática, este parâmetro indica o quão eficientemente um fluoróforo converte a energia de excitação em fluorescência.

$$\Phi = \frac{\textit{taxa radiativa}}{\textit{taxa radiativa} + \textit{taxa não radiativa}}; \quad (3)$$

Muitos parâmetros podem ainda influenciar na emissão fluorescente, como por exemplo, pH, temperatura, presença de íons, ligações de hidrogênio, entre outros. A variação destes parâmetros pode intensificar ou diminuir a eficiência quântica, podendo ainda deslocar o comprimento de onda de absorção ou emissão. Por fim, um dos princípios mais importantes com relação aos fluoróforos é de que o espectro de emissão é sempre idêntico, independente do comprimento de onda de excitação. A emissão varia apenas em sua intensidade (VALEUR, 2001).

2.4 SONDAS FLUORESCENTES

Sondas fluorescentes consistem em uma modalidade de materiais utilizados para obtenção de imagens a nível celular. Seu emprego apresenta vantagens como (i) visualização de processos fisiológicos com alta resolução temporal e espacial; (ii) rastreamento de moléculas tanto *in vitro* quanto *in vivo*; (iii) substituição de ensaios radioativos; (iv) e observação de processos patológicos causados por doenças (DRUMMEN, 2012). Estas sondas, por se basearem no princípio de fluorescência, emitem luz ao serem excitadas em comprimentos de onda específicos, revelando sua localização. Um fator de grande limitação na obtenção de imagens é o espalhamento da luz, afetando principalmente imagens *in vivo*. O espalhamento ocorre nos tecidos e se deve basicamente à componentes como o sangue e água (MÉRIAN et al., 2012).

Há duas classes de sondas fluorescentes, intrínsecas e extrínsecas, sendo a primeira caracterizada pela fluorescência da sonda em si, e a segunda, pela associação de um fluoróforos à sonda (matriz), que à ela confere fluorescência (VALEUR, 2001). Os quantum dots são exemplos de peso para a classe de sondas intrínsecas, pois além de apresentarem alto rendimento quântico de fluorescência, podem emitir em comprimentos de onda modulados por diferentes tamanhos. No entanto, apesar das vantagens citadas, apresentam problemas por citotoxicidade, o que restringe seu emprego na área biomédica. Outras sondas intrínsecas consistem em nanopartículas de ouro, sílica e óxidos (CORMODE et al., 2009).

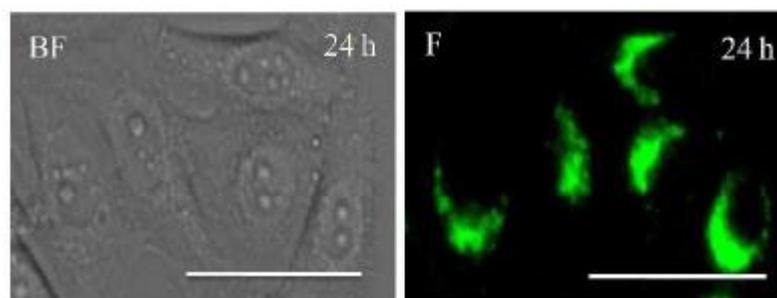
CdSe, um dos quantum dots mais brilhantes e amplamente disponíveis para aplicação em bioimagem, foi estudado por Ye, et al. (2012) e reportado que grande quantidade do Cádmio proveniente da dose inicial desses quantum dots ficou acumulada no fígado, baço e rins de macacos rhesus por 3 meses após a injeção intravenosa. Este resultado indica que a limpeza de quantum dots é bastante lenta, apresentando potencial impacto pela presença desses metais pesados no organismo.

Nas sondas extrínsecas, por sua vez, o fluoróforo encontra-se ligado à superfície ou encapsulado em uma matriz de constituição polimérica ou lipídica. Poli(ácido láctico) (PLA) ou poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) são nanomateriais sintéticos amplamente empregados, pois são biocompatíveis e biodegradáveis (MAKADIA; SIEGEL, 2011; MÉRIAN et al., 2012). Já os polímeros

naturais incluem, por exemplo, proteínas ou polissacarídeos como dextranos (LENCER et al., 1990) e quitosana. O corante fluorescente mais utilizado é o isotiocianato de fluoresceína (FITC), proveniente da modificação da molécula de fluoresceína (HERMANSON, 2013).

Min, et al. (2013) sintetizaram nanopartículas de quitosana-tetrafeniletileno (Q-TPE) para obtenção de imagem celular. As nanopartículas de quitosana-TPE foram obtidas pelo método de gelificação iônica e apresentaram tamanhos de 170 nm (PDI 0,13), formato esférico e superfícies carregadas positivamente. Este trabalho, no entanto, utiliza o TPE, molécula não emissiva em solução, mas que é induzida à emissão pela formação de agregados. Baseado no mesmo efeito emissivo por agregados, Mandal, et al. (2018) também sintetizaram nanopartículas de quitosana-tetrafeniletileno-trifenilfosfônio (Q-TPE-TPP) as quais foram incubadas em células HeLa, revelando a marcação celular e localização das nanopartículas dentro das células (FIGURA 5).

Figura 5 - Células marcadas com Q-TPE-TPP, (BF) campo brilhante e (F) fluorescência. Barra de escala de 50 microns.



Fonte: MANDAL, et al. (2018).

2.5 SISTEMAS CARREADORES E DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Os sistemas carreadores de fármacos podem ser vistos como uma analogia às sondas extrínsecas, pois, assim como o fluoróforo, o fármaco se encontra associado à matriz. Os fundamentos destas duas abordagens encontram ainda similaridades quanto às inúmeras variáveis que exercem influência na sua aplicação, fato que justifica o esforço e dedicação ao estudo destes sistemas de grande complexidade.

A administração convencional de fármacos, oral ou intravenosa, faz com que a concentração do fármaco no sangue seja diretamente proporcional à dose utilizada. Esta situação proporciona um aumento repentino da concentração do fármaco no

organismo seguido pela diminuição brusca destes níveis, devido à sua absorção. Desta forma, são necessárias múltiplas administrações para que se obtenha o efeito terapêutico por maiores períodos de tempo (HALEY; FRENKEL, 2008; KIM et al., 2009).

Neste contexto, os sistemas carreadores de fármacos apresentam vantagens sobre as formulações convencionais, não apenas com relação à sua concentração. Em geral, nanocarreadores proporcionam vantagens como: proteção do fármaco contra degradação, aumento do tempo de circulação no sangue, aumento da absorção do fármaco por facilitar a difusão pelo epitélio, modificação da farmacocinética e perfil de distribuição do fármaco, além de facilitar a penetração intracelular (EKINCI et al., 2015).

O avanço na ciência dos polímeros tem importante papel na tecnologia de carregamento e liberação de fármacos, utilizando-os em funções físicas, como suportes mecânicos, e funções químicas, estabilizando e melhorando a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (KIM et al., 2009). Nanopartículas poliméricas apresentam estabilidade e são passíveis de modificações na superfície, além de apresentarem biocompatibilidade e biodegradabilidade (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SINGH; LILLARD JR, 2009). Outras classes de nanopartículas também são investigadas e, inclusive, possuem aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para usos clínicos. Segundo Ventola (2017), dentre estas classes, 34% são poliméricas, 30% nanocristais, 20% lipossomas e os 16% restantes se dividem em sistemas baseados em materiais inorgânicos e proteínas.

Os nanocarreadores podem ser de dois tipos: nanoesferas e nanocápsulas, como representado na Figura 6.

Figura 6 - Representação dos tipos de nanocarreadores.



Fonte: Da autora.

As nanoesferas consistem em uma estrutura, ou matriz, na qual o fármaco pode estar associado em todo seu volume ou adsorvido na superfície. Já as nanocápsulas são sistemas reservatórios, em que o fármaco se encontra aprisionado em seu interior (KIM et al., 2009; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Um sistema carreador ideal deve apresentar elevada capacidade de incorporação do fármaco, podendo este ser incorporado durante ou após a síntese das nanopartículas (SOPPIMATH et al., 2001). A quantidade de fármaco a elas associado, por sua vez, depende da interação entre fármaco e nanopartícula e também das condições do método de incorporação (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Partículas de menores tamanhos possuem elevada razão entre área de superfície e volume, desta forma, o fármaco tende a estar associado na superfície da partícula ou próxima a ela, levando a uma liberação mais rápida. Em contrapartida, partículas maiores têm maior capacidade para a associação do fármaco, apresentando, no entanto, menores taxas de liberação (SINGH; LILLIARD JR, 2009). Todavia, o sistema de liberação sofre ainda influência de diferentes fatores.

O mecanismo de liberação do fármaco é o que rege o sistema de liberação. O fármaco pode ser liberado por (i) desorção da superfície da nanopartícula, (ii) difusão através da matriz da nanoesfera ou através da parede da nanocápsula, ou ainda pela (iii) degradação do polímero (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). A degradação do polímero ocorre por hidrólise ou por ação de enzimas, e seus produtos não tóxicos e biocompatíveis são metabolizados ou excretados por vias fisiológicas normais. Na prática, dificilmente ocorre apenas um dos mecanismos citados. A liberação é resultado de uma combinação de mais de um mecanismo, havendo a predominância de um deles (SINGH; LILLIARD JR, 2009; SOPPIMATH et al., 2001).

Na administração de um sistema de carreamento e liberação de fármaco, apenas uma fração da dose atinge seu sítio de atuação devido à distribuição deste por outros tecidos ou à sua precoce metabolização ou excreção (KIM et al., 2009). Para que este sistema alcance seu sítio, é necessário que ultrapasse as barreiras de defesa do organismo como as mucosas e os macrófagos. A capacidade de ultrapassar estas barreiras, por sua vez, está relacionada ao tamanho da partícula, carga da superfície e hidrofobicidade. Partículas com diâmetros maiores que 200 nm estão mais propensas ao reconhecimento pelo sistema de defesa e são mais

facilmente fagocitadas. Com relação à carga de superfície, superfícies catiônicas promovem a interação das nanopartículas com a mucosa das células, facilitando a liberação do fármaco devido ao maior tempo de contato. Por fim, partículas com superfícies hidrofóbicas são eliminadas mais rapidamente do que as de superfícies hidrofílicas. Isto ocorre porque as proteínas que promovem a opsonização (processo de adsorção de proteínas à partícula) preferem superfícies hidrofóbicas, facilitando a ação dos macrófagos. A otimização destes três parâmetros, aumenta o tempo de circulação do sistema nanopartícula-fármaco no organismo, favorecendo sua ação (ALEXIS et al., 2008; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010; TIYABOONCHAI, 2003).

Um processo passivo liberação de fármaco no tratamento de câncer consiste na retenção e permeação melhorada (em inglês, EPR effect) do conjunto NP-fármaco. Este processo de direcionamento passivo do sistema carreador até o sítio alvo é baseado no aumento da vascularização da região no organismo onde se encontram as células cancerígenas. Estas células se desenvolvem rapidamente e esta ação demanda muitos nutrientes e oxigênio, desta forma, nanopartículas carreadoras de fármacos anticâncer podem ser seletivamente direcionadas à região do tumor (ALEXIS et al., 2008; KIM et al., 2009). Outra estratégia para melhorar a entrega do fármaco ao sítio alvo consiste na associação de ligantes às nanopartículas, aumentando a especificidade e seletividade da sua distribuição (KIM et al., 2009).

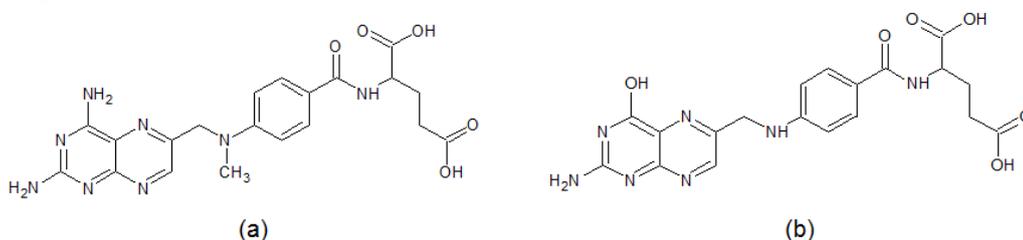
2.6 METOTREXATO

O metotrexato (MTX) é um fármaco que tem sido utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer como leucemia, câncer de pulmão, de mama, cabeça e pescoço, e também no tratamento de doenças autoimunes (MALAIYA; YADAV, 2018; TRAN et al., 2013). Este fármaco consiste em um pó cristalino amarelado, de massa molar de 454,4 g/mol, sendo praticamente insolúvel em água e solventes orgânicos (etanol, clorofórmio e éter), mas apresenta solubilidade em soluções diluídas de hidróxidos e carbonatos alcalinos. Apresenta três valores de pKa: 3,8 e 4,8 (grupamentos carboxílicos) e 5,6 (função nitrogenada), por isso sua solubilidade em meio aquoso é dependente do pH (RAHMAN; CHHABRA, 1988).

O MTX (FIGURA 7a), também conhecido como ametofterina, é estruturalmente análogo ao ácido fólico (FIGURA 7b), diferindo apenas na

substituição de um grupo hidroxila por um grupo amina e na adição de um grupo metila.

Figura 7 - Estrutura molecular do (a) metotrexato e (b) ácido fólico.



Fonte: Da autora.

Por ser análogo ao ácido fólico, o MTX apresenta elevada afinidade à enzima diidrofolato redutase (DFHR). Ao se ligar à DFHR, o MTX interfere na via metabólica do ácido fólico, bloqueando a conversão de ácido diidrofolato (DHFA) em ácido tetraidrofolato (THFA), atuando na fase S do ciclo celular. Por conseguinte, o MTX representa um substrato competitivamente inibidor à atividade da enzima, que está envolvida na síntese de DNA e RNA. Portanto, a inibição dessas vias tem como resultado a interrupção da replicação do DNA e morte celular. A ação do MTX é mais marcante em populações celulares em fase de crescimento exponencial (fase S), o que se relaciona com seu efeito seletivo sobre células tumorais e ação sobre tecidos em proliferação (ABOLMAALI; TAMADDON; DINARVAND, 2013; MALAIYA; YADAV, 2018).

Quanto à posologia, diversos regimes podem ser adotados na utilização do MTX, doses de 14 mg a 40 mg por semana, sendo que a via de administração frequentemente utilizada no tratamento de tumores é a intravenosa (WIDEMANN; ADAMSON, 2006). Apesar de ser um dos fármacos de grande aplicação no tratamento de câncer, a principal razão para a descontinuação de seu uso não é a falta de eficácia, mas a toxicidade (ABOLMAALI; TAMADDON; DINARVAND, 2013; GAIES et al., 2012). O maior desafio é entregar o agente quimioterápico às células cancerígenas sem influenciar nos tecidos normais (TAHIR et al., 2017). Algumas vantagens estudadas nos sistemas de entrega de MTX são melhores taxas de liberação do fármaco nos seus respectivos sítios alvos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Preparar e caracterizar nanopartículas fluorescentes de quitosana produzidas a partir de despolimerização em meio ácido, sob condições hidrotérmicas, e, posteriormente, incorporar metotrexato às nanopartículas e caracterizá-las.

3.2 ESPECÍFICOS

- (a) Avaliar o efeito dos diferentes ácidos utilizados como agentes de despolimerização e das diferentes condições de temperatura e tempos de exposição nas propriedades das nanopartículas de quitosana;
- (b) Caracterizar as partículas quanto à distribuição de tamanhos hidrodinâmicos, potencial zeta, grupos funcionais (FTIR), absorção UV-Vis, emissão fluorescente e morfologia (MEV);
- (c) Determinar a eficiência quântica de fluorescência das nanopartículas de quitosana;
- (d) Realizar a análise térmica das nanopartículas por meio de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- (e) Incorporar e determinar a eficiência de incorporação do metotrexato nas nanopartículas;
- (f) Caracterizar as nanopartículas de quitosana-metotrexato quanto ao tamanho hidrodinâmico, potencial Zeta, FTIR, TG, DSC e MEV.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados neste trabalho foram quitosana de média massa molecular, grau de desacetilação 75-85% (Sigma-Aldrich, EUA), ácido clorídrico (Synth), ácido cítrico (Vetec), ácido acético (Synth), metotrexato (pureza 99,2%).

Para a síntese das nanopartículas foram utilizados reator autoclave com capacidade de 50 ml, membrana de diálise com corte molecular de 3,5kDa e filtros de seringa de PES de 0,44 e 0,22 μm .

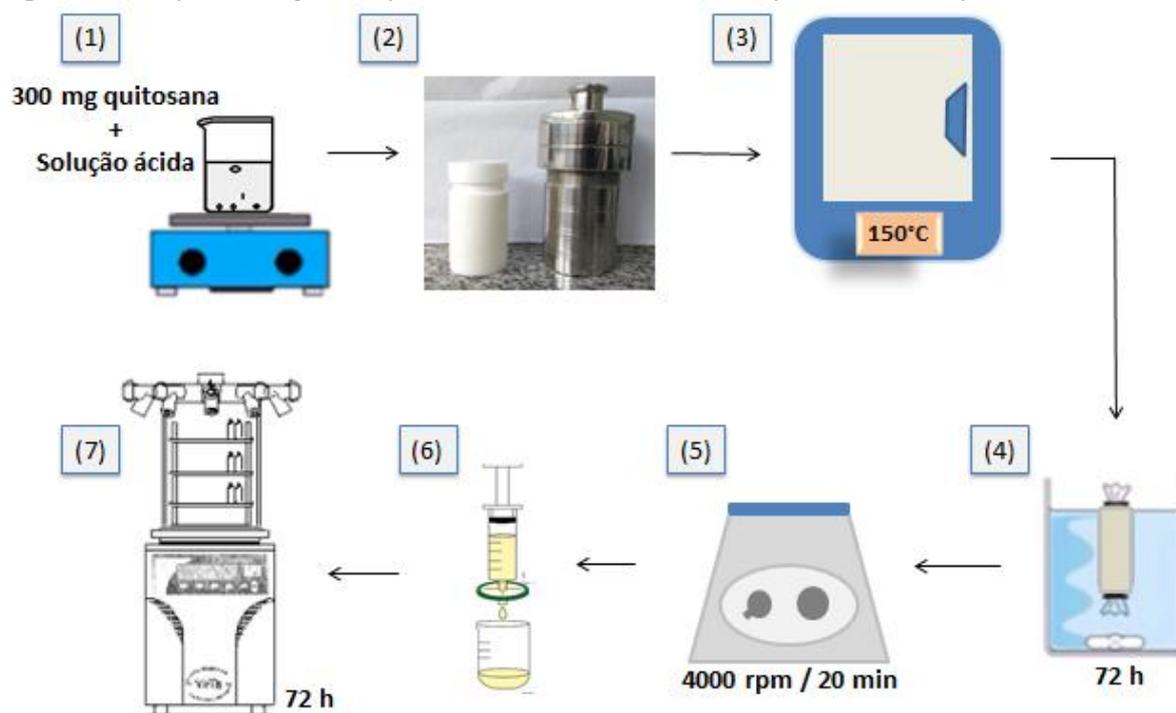
Utilizou-se ainda, água deionizada, estufa (Solab - SL100), centrífuga (Centrifugal Machine 800-1), minicentrífuga (Bio Lion XC-4610K) e liofilizador (Solab - SL404).

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.2.1 Preparo das nanopartículas

A metodologia de síntese das nanopartículas foi realizada empregando-se três diferentes ácidos (ácido clorídrico, ácido cítrico e ácido acético). O procedimento para a síntese está esquematizado na Figura 8 e foi realizado da seguinte forma: (1) 300 mg de quitosana foram adicionados a 30 ml de solução acidificada, sob agitação magnética, obtendo-se uma solução viscosa. A solução polimérica foi deixada em agitação por 120 minutos para completa solubilização do polímero e o sistema foi então (2) transferido para um recipiente de teflon, o qual foi inserido em um compartimento rosqueável de inox e (3) colocado na estufa pré-aquecida para tratamento hidrotérmico (TH). Ao término do tratamento, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente.

Figura 8 – Representação esquemática da síntese de nanopartículas de quitosana.



Fonte: Da autora.

Na etapa seguinte, (4) o sistema foi dialisado. Para isto, a solução foi transferida para uma membrana de diálise, a qual foi amarrada nas extremidades com fio de nylon formando um saco. Os sacos de diálise foram colocados em 3 litros de água deionizada sob agitação lenta para facilitar o fluxo de difusão. A água foi trocada a cada 8 horas e o sistema permaneceu em diálise por 72 horas.

Posteriormente, (5) a solução de nanopartículas foi centrifugada à 4000 rpm por 20 minutos para separação das partículas maiores e o sobrenadante foi (6) filtrado em filtros de seringa de 0,44 e 0,22 μ m. Por fim, o sistema foi congelado em nitrogênio líquido e submetido à (7) liofilização por 72 horas.

As condições de tratamento hidrotérmico empregadas para cada tipo de ácido estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições de tratamento hidrotérmico empregadas para os ácidos.

	Condições de TH					
	60 min	150 °C 90 min	120 min	60 min	180 °C 90 min	120 min
HCl	x	X	x	x	x	x
AC			x		x	
AAc			x		x	

Fonte: Da autora.

Primeiramente, foram realizadas seis condições de TH utilizando ácido clorídrico com as temperaturas de 150 e 180°C associadas aos tempos de exposição de 60, 90 e 120 minutos. A síntese com HCl foi tomada como triagem para o emprego dos ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido acético), com os quais foram replicadas as duas condições de TH que forneceram os melhores resultados para diâmetro de partícula.

As soluções acidificadas para solubilização da quitosana foram preparadas com 1% HCl (v/v). A solução de ácido acético foi preparada 1% (v/v), já a solução de ácido cítrico 1,66% (m/v).

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

As análises foram realizadas no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, da marca Agilent Technologies, modelo Cary 630. O intervalo de varredura foi de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Esta análise foi realizada com a quitosana em pó, com as nanopartículas liofilizadas e com as nanopartículas incorporadas com metotrexato. Não houve necessidade de preparo prévio das amostras.

4.2.3 Diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, assim como o potencial Zeta, foram medidos no equipamento Zetasizer Nano, Malvern, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas. A técnica utilizada para obtenção dos tamanhos foi espalhamento de luz dinâmico (DLS). Na etapa de triagem, esta análise foi realizada com as amostras obtidas após o TH, sem diluição. Já nas análises seguintes, as medições foram realizadas após a ressuspensão das nanopartículas liofilizadas em água deionizada, com concentração de 1 mg/mL, bem como, para as nanopartículas incorporadas com metotrexato.

4.2.4 Espectroscopia de absorção UV-Visível

Os espectros de absorção UV-Vis foram obtidos no espectrômetro UV-Vis, Agilent Technologies, modelo Cary 60. As varreduras foram realizadas de 200 a 800nm com velocidade de 200 nm por minuto, em cubeta de quartzo. A varredura foi realizada com as nanopartículas liofilizadas resuspensas em água deionizada, com concentração de 1 mg/ml.

4.2.5 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de excitação e emissão das nanopartículas de quitosana foram obtidos no espectrômetro de fluorescência Perkin Elmer, modelo LS 55, em cubeta de vidro, em temperatura ambiente, utilizando abertura de fenda de 15 nm e velocidade de escaneamento de 200 nm por minuto.

O comprimento de onda de máxima absorção UV-Vis foi colocado como comprimento de onda de excitação para obtenção do espectro de emissão, e, em sequência, o comprimento de onda de máxima emissão foi utilizado para obtenção do espectro de excitação das nanopartículas. Estas análises também foram realizadas com as nanopartículas resuspensas em água deionizada e concentração de 1 mg/mL.

4.2.5.1 Eficiência quântica de fluorescência

Na avaliação da eficiência quântica das nanopartículas o material de referência utilizado foi 2-aminopiridina (2-AMP), cuja eficiência quântica de fluorescência é de $0,60 \pm 0,05$, e apresenta região de excitação e emissão semelhantes à das nanopartículas. Como solvente para 2-AMP, foi utilizado solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1N, cujo índice de refração é 1,63 (EATON, 1988; RUSAKOWICZ; TESTA, 1968). Para as nanopartículas, o solvente utilizado foi água deionizada, índice de refração 1,33. A fim de garantir a linearidade entre as concentrações e suas respectivas absorbâncias, foram realizadas diluições das amostras para cada tomada de dados. Todas as concentrações, dos materiais de referência e de estudo, proporcionaram absorbâncias inferiores a 0,4, e a metodologia foi conduzida a temperatura ambiente.

A eficiência quântica foi determinada utilizando-se a Equação 5, que relaciona o material padrão (referência) com o material de estudo.

$$\Phi = \Phi_{ref} \left(\frac{I}{I_{ref}} \right) \left(\frac{A_{ref}}{A} \right) \left(\frac{n}{n_{ref}} \right)^2 ; \quad (5)$$

em que: Φ é a eficiência quântica de fluorescência; I é a área integrada do espectro de emissão; A é a absorvância; n é o índice de refração do solvente; e o sub-índice “ref” se refere aos valores para a referência.

Os parâmetros dos equipamentos foram os mesmos para todas as coletas de dados. Foram utilizados o mesmo espectrofotômetro do item 4.2.4, com velocidade de escaneamento de 200 nm por minuto, e o mesmo espectrofluorímetro do item 4.2.5, com velocidade de varredura de 200 nm por minuto e abertura de fenda de 2,5.

4.2.6 Análise Térmica

O estudo do comportamento térmico da quitosana, das nanopartículas obtidas por TH e com as nanopartículas incorporadas com metotrexato foi realizado por meio de análise termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

As duas análises, TG e DSC, foram conduzidas no equipamento Netzsch STA 449 F3, utilizando uma massa de aproximadamente 3 mg de amostra e cadinho de alumina. As amostras foram submetidas a um aquecimento controlado de 30 a 900°C em atmosfera de nitrogênio, utilizando razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e fluxo de gás de arraste de 100 mL.min⁻¹.

4.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das nanopartículas obtidas pelo tratamento hidrotérmico com os diferentes ácidos (ácido clorídrico, ácido cítrico e ácido acético) e das nanopartículas incorporadas com metotrexato foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Leo Electron, modelo 440i, operando a 15 kV, do Laboratório de Recursos Analíticos e

de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química - Unicamp. No preparo das amostras, suspensões de NPs em água deionizada com concentração de 2 mg/mL foram depositadas em lamínulas, que foram revestidas com ouro utilizando Sputter Coater EMITECH, modelo K450.

4.2.8 Incorporação do metotrexato às nanopartículas

Para incorporação do fármaco e posterior caracterização do sistema, foram selecionadas as nanopartículas de menor tamanho obtidas pela condição de tratamento hidrotérmico de 180°C por 90 minutos utilizando ácido clorídrico.

Primeiramente, 5 mg de nanopartículas de quitosana foram resuspensas em 5 ml água deionizada, seguido da adição de 0,5 mg de metotrexato em pó, com o sistema sob agitação magnética. A suspensão foi deixada sob agitação por 24 horas para otimização do processo de incorporação do fármaco, que foi realizado à temperatura ambiente.

4.2.9 Análise quantitativa do MTX

A análise quantitativa do MTX foi realizada utilizando-se espectrofotômetro UV-vis, Agilent Technologies, modelo Cary 60, em cubeta de quartzo.

4.2.9.1 Seleção do comprimento de onda representante do MTX

O comprimento de onda de máxima absorção do MTX foi determinado através do seu espectro de absorção. Para tanto, este foi solubilizado em água até a obtenção de uma solução saturada e então foi realizada varredura de 200 a 400 nm.

4.2.9.2 Determinação da curva padrão do MTX

Partindo-se de uma solução de MTX de concentração 0,06 mg/ml, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos e o volume foi completado com água para obtenção de soluções analíticas com diferentes concentrações, de 0,06 a 0,025 mg/ml, utilizando água como branco. A absorbância foi determinada em 305 nm com análises em triplicata para cada concentração. Posteriormente, foi

construído o gráfico de concentração do fármaco em função dos valores de absorvância ($\lambda = 305 \text{ nm}$) e então obtida a equação da reta por regressão linear, bem como o coeficiente de correlação da curva analítica (R^2). A curva de calibração está apresentada no Anexo A.

4.2.9.3 Avaliação da eficiência de incorporação

Após a incorporação do fármaco às nanopartículas, uma gota de solução 1 N de NaOH foi utilizada para aumentar o pH da suspensão a fim de que as nanopartículas fossem separadas por centrifugação. Desta forma, o sistema foi centrifugado a 10.000 rpm em minicentrífuga Bio Lion XC-4610K por 20 minutos. O sobrenadante foi analisado através de espectroscopia de UV-Vis no comprimento de onda de 305 nm e o teor de MTX incorporado às nanopartículas foi calculado consultando-se a curva analítica previamente obtida.

Por fim, a eficiência de incorporação (EI%) foi calculada utilizando-se a Equação 6:

$$EI (\%) = 1 - \frac{\text{concentração de MTX livre no sobrenadante}}{\text{concentração de MTX adicionada inicialmente}} \times 100; \quad (6)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRIAGEM

Nesta seção, estão apresentados os resultados obtidos para a síntese de nanopartículas de quitosana utilizando solução de HCl. Para tanto, foram empregadas seis condições de síntese e as partículas foram analisadas segundo tamanho de partícula e aparência visual das suspensões. Após o tratamento hidrotérmico, amostras passaram por centrifugação a 4000 rpm e filtração com filtros de seringa (0,44 e 0,22 μm).

5.1.1 Diâmetro hidrodinâmico

Na Tabela 2 estão apresentados os tamanhos médios e índices de polidispersividade (PDI) obtidos para a quitosana em solução acidificada (Q-HCl sem TH) e para as partículas resultantes do tratamento hidrotérmico.

A coleta de dados foi realizada após o tratamento hidrotérmico dos sistemas, e, as condições de processamento que proporcionaram menores tamanhos de partículas e melhor aparência visual foram escolhidas para a continuação da metodologia e posteriores análises.

Tabela 2- Tamanho médio e índice de polidispersividade (PDI) das partículas.

AMOSTRAS	Diâmetro médio	PDI
Q-HCl sem TH	14,37 \pm 2,26 μm	0,63 \pm 0,11
NP Q-HCl 150°C 60'	1,69 \pm 0,50 μm	0,41 \pm 0,04
NP Q-HCl 150°C 90'	354,5 \pm 7,2 nm	0,45 \pm 0,05
NP Q-HCl 150°C 120'	172,6 \pm 1,0 nm	0,24 \pm 0,01
NP Q-HCl 180°C 60'	202,4 \pm 2,2 nm	0,26 \pm 0,01
NP Q-HCl 180°C 90'	130,7 \pm 0,7 nm	0,23 \pm 0,01
NP Q-HCl 180°C 120'	112,5 \pm 1,4 nm	0,17 \pm 0,01

*Amostras com pH = 1,0.

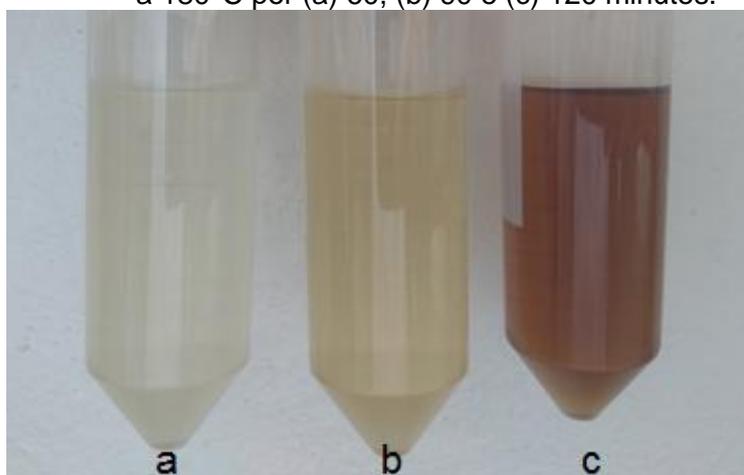
Fonte: Da autora.

Através destes dados foi possível observar que o tratamento hidrotérmico foi efetivo na diminuição das cadeias polissacarídeas e que a diminuição dos tamanhos das partículas foi proporcional ao tempo de exposição para cada temperatura. Este

comportamento era esperado, pois maiores tempos de reação possibilitam uma maior taxa de redução das cadeias polissacarídeas, proporcionando maior tempo para a ocorrência da hidrólise ácida das ligações glicosídicas (HUANG et al., 2013; JIAYIN; JIANMIN, 2006; VARUM; OTTOY; SMIDSRD, 2001; YANG et al., 2012).

Na Figura 6 estão apresentados os sistemas tratados a 180°C, em que é possível observar a diferença de coloração das suspensões submetidas aos diferentes tempos de exposição. Embora o TH a 180°C por 120 minutos tenha resultado no menor tamanho de partícula, a solução apresentou uma coloração marrom (Figura 6c), indicando a decomposição das cadeias da quitosana. Desta forma, o mesmo foi desconsiderado por alterar a integridade das nanopartículas (JIAYIN; JIANMIN, 2006). As condições de 150°C por 120 minutos e 180°C por 90 minutos resultaram em menores diâmetros médios de partículas, apresentando ainda baixos índices de polidispersividade (PDI), menores que 0,3. Conseqüentemente, estas condições de síntese foram escolhidas para os estudos posteriores.

Figura 9 - Amostras de Q-HCl tratadas hidrotérmicamente a 180°C por (a) 60, (b) 90 e (c) 120 minutos.



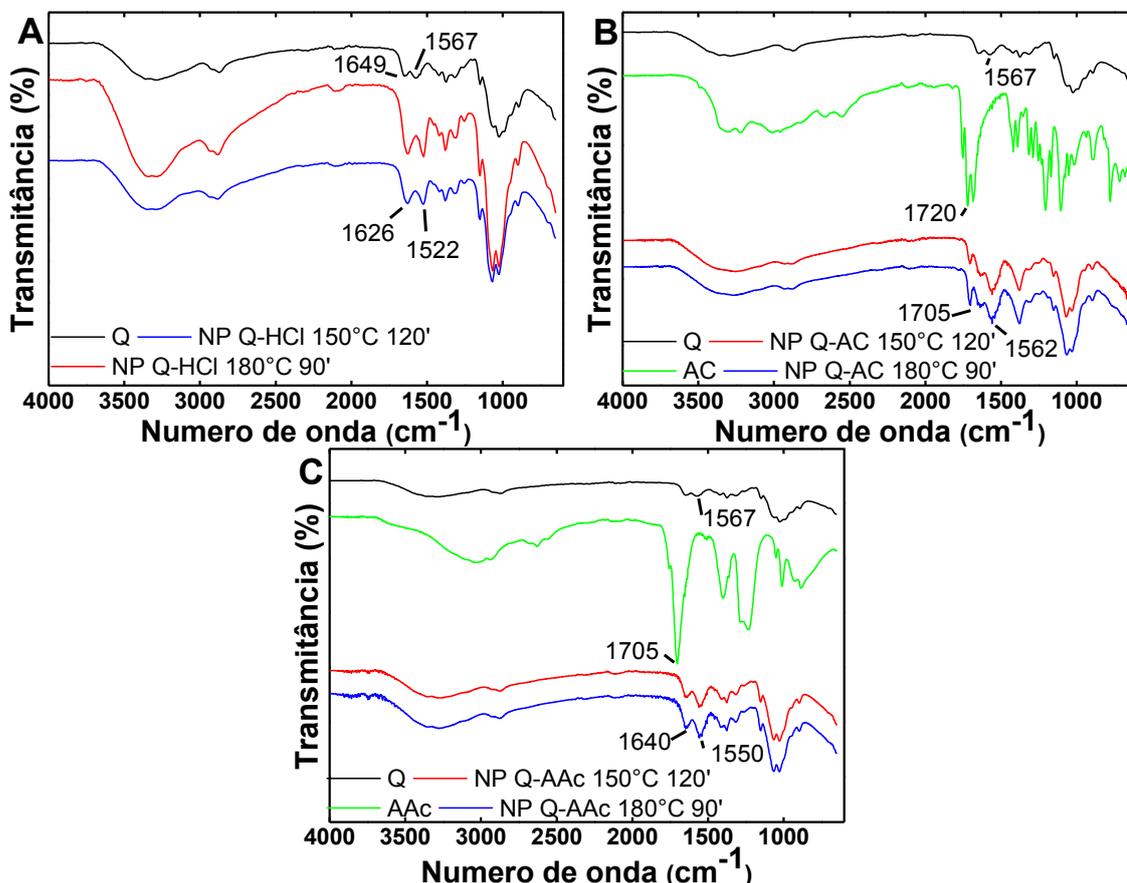
Fonte: Da autora.

5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

As amostras foram submetidas à análise de FTIR, cujos espectros estão apresentados na Figura 10, na qual as principais bandas estão destacadas e posteriormente relacionadas na Tabela 3. As curvas em preto representam o

espectro da quitosana em pó, que foi o material de partida, curvas em verde representam os ácidos, e, curvas em vermelho e azul, as NPs.

Figura 10 - Espectros FTIR. A: quitosana e NPs de Q-HCl; B: quitosana, AC e NPs de Q-AC e C: quitosana, AAc e NPs de Q-AAc.



Fonte: Da autora.

Todos os espectros apresentaram uma ampla banda de absorção compreendida entre 3000 e 3500 cm^{-1} que se associa ao estiramento O-H com sobreposição de estiramento N-H, indicando ligações de hidrogênio entre as moléculas. A região entre 1400 e 1700 cm^{-1} compreende a absorção dos grupos carbonila (C=O), amina (NH_2) e amônio (NH_3^+), com absorções próximas a 1650 cm^{-1} (amida I), 1590 cm^{-1} (amida II) e 1514 cm^{-1} , respectivamente (OSMAN; AROF, 2003).

O espectro da quitosana apresenta bandas de baixa intensidade situadas em 1649 cm^{-1} e 1567 cm^{-1} . Estas bandas aparecem deslocadas para menores números de onda nos espectros das nanopartículas de Q-HCl, 1626 cm^{-1} e 1522 cm^{-1} ,

respectivamente, refletindo a interação entre o grupo amino e o ácido (ORIENTI et al., 2002).

No espectro do ácido cítrico, a banda em 1720 cm^{-1} se caracteriza pelo estiramento C=O da carboxila. Esta banda apresenta-se deslocada nos espectros de Q-AC (1562 cm^{-1}) devido ao estiramento assimétrico de COO^- , após interação iônica com a quitosana. Comportamento similar ocorre com esta banda, que aparece em 1705 cm^{-1} no espectro do ácido acético, deslocando-se para 1550 cm^{-1} nos espectros das nanopartículas de Q-AAc (DEMARGER-ANDRE; DOMARD, 1994; OSMAN; AROF, 2003). Nos espectros das nanopartículas de quitosana, a banda de NH_3^+ está ausente, o que reforça a ocorrência da interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ da quitosana e os ácidos. (OSMAN; AROF, 2003).

Para as nanopartículas de Q-AC observa-se ainda uma banda em 1705 cm^{-1} devido à absorção da carbonila, sugerindo a presença de grupos carboxílicos livres (CERVERA et al., 2011). Já para NPs de Q-AAc, a banda em 1640 cm^{-1} sugere uma maior incidência de amida I, fato também reportado por Cervera, et al. (2011) e Nunthanid et al. (2004), em que, devido à associação de altas temperaturas, o íon acetato favorece a conversão em N-acetilglucosamina, grupo característico da quitina.

As demais bandas em menores números de onda se caracterizam por vibrações na estrutura polissacarídica da quitosana (DEMARGER-ANDRE; DOMARD, 1994).

Não foi observada diferença significativa entre os espectros das nanopartículas obtidas pela utilização do mesmo ácido. Este resultado indica que os dois tipos de tratamentos (150°C por 120 minutos e 180°C por 90 minutos) proporcionaram partículas similares quanto às características estruturais.

Tabela 3 – Principais bandas identificadas nos espectros de FTIR e seus respectivos grupos funcionais.

Região de absorção (cm ⁻¹)	Atribuição	Q (cm ⁻¹)	NP Q-HCl (cm ⁻¹)	NP Q-AC (cm ⁻¹)	NP Q-AAc (cm ⁻¹)
3400-3300	O-H v	3305	3320	3270	3273
3475-3150	N-H v				
1760-1690	C=O v	-	-	1705	-
1660-1540	N-H v	1649/1567	1626/1522	1562	1550
1480-1350	C-H δ	1373	1380	1380	1375
1250-1050	C-O-C v	1149	1149	1155	1150
1200-1020	C-O-H v	1022	1022/1067	1030/1066	1030/1068
950-910	O-H δ	895	895	892	892

*v: estiramento; δ: dobramento.

Fonte: Da autora.

5.4 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA

As médias de diâmetro hidrodinâmico e respectivos potenciais Zeta das nanopartículas de quitosana liofilizadas e resuspensas em água deionizada estão apresentados na Tabela 4. Estes resultados mostraram que não houve um comportamento definido para os diâmetros hidrodinâmicos das partículas que possa estabelecer relação com a temperatura utilizada no tratamento hidrotérmico para as amostras de mesmo tipo de ácido empregado na síntese. Por exemplo, na síntese com ácido clorídrico, a temperatura de 180°C resultou no menor tamanho de partícula, já na síntese com ácido cítrico, o menor tamanho foi apresentado pela síntese com temperatura de 150°C.

Tabela 4 - Tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial Zeta das partículas liofilizadas.

Amostras	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NPs Q-HCl 150°C 120'	168,0 ± 10,0	0,34 ± 0,05	+ 33,3 ± 5,8
NPs Q-HCl 180°C 90'	147,3 ± 1,9	0,24 ± 0,01	+ 44,7 ± 0,5
NPs Q-AC 150°C 120'	290,2 ± 1,2	0,18 ± 0,01	+ 21,3 ± 0,1
NPs Q-AC 180°C 90'	322,3 ± 3,9	0,34 ± 0,03	+ 16,8 ± 0,2
NPs Q-AAc 150°C 120'	1183,0 ± 37,0	0,75 ± 0,06	+ 29,7 ± 3,3
NPs Q-AAc 180°C 90'	1203,6 ± 45,4	0,66 ± 0,05	+ 31,5 ± 1,2

*pH entre 4 e 5.

Fonte: Da autora.

As partículas preparadas com solução de HCl 1% (v/v) apresentaram duas populações de partículas (dados mostrados no Anexo B), sendo que a condição de 180°C por 90 minutos de tratamento proporcionou menor tamanho de partícula, menor índice de polidispersividade, apresentando ainda alta estabilidade física das nanopartículas em suspensão.

Para as partículas sintetizadas com solução de ácido cítrico, os diâmetros médios obtidos foram aproximadamente o dobro dos tamanhos obtidos com a utilização de um ácido forte como o HCl em solução. Comportamento similar pode ser observado para as partículas de Q-AAc, em que foram obtidos tamanhos micrométricos para as partículas quando foi utilizado solução de ácido acético. Este ácido apresenta pKa de 4,8, enquanto que o ácido cítrico possui pKa de 3,08. Desta forma, sugere-se que a menor taxa de dissociação do ácido acético em água estabeleça influência na despolimerização das cadeias da quitosana, diminuindo a ocorrência da hidrólise ácida e, conseqüentemente, a solubilidade da quitosana em água.

Adicionalmente, um comportamento interessante foi que, as nanopartículas de Q-AAc, ao serem resuspensas em água, não solubilizaram totalmente. Este fato foi reportado na literatura como a acetilação das unidades N-acetilglucosamina devido à associação de altas temperaturas na síntese, fazendo com que a solubilidade da quitosana diminua (CERVERA et al., 2011). Sugere-se que a solubilidade parcial das NPs de Q-AAc contribuiu para o aumento dos tamanhos médios de partícula obtidos para esta síntese.

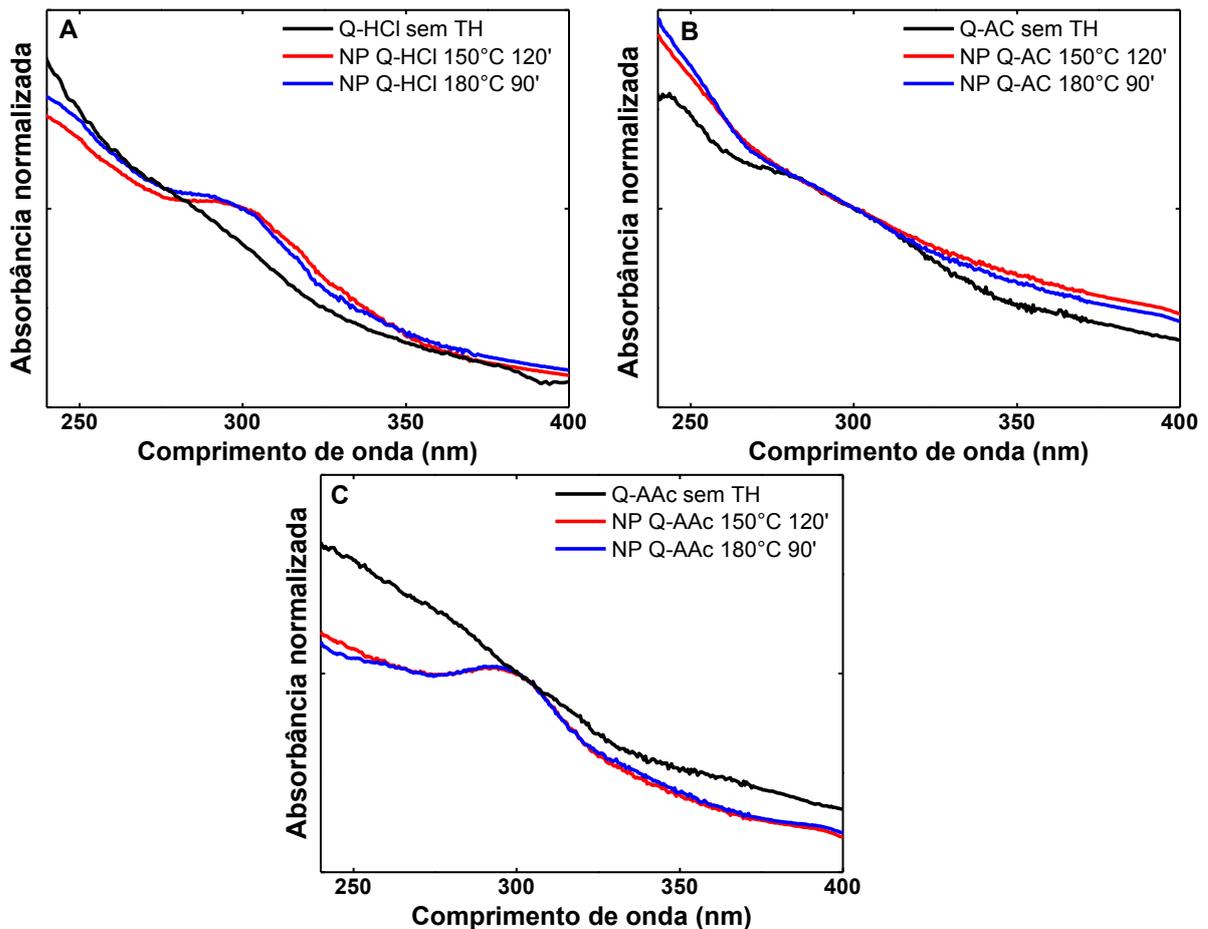
A interação da quitosana com os ácidos orgânicos faz com que grupos COOH^- equilibrem as cargas positivas NH_3^+ da quitosana, ocorrendo, assim, a diminuição do potencial Zeta. A síntese com ácido cítrico (ácido terciário) reflete este fato, cujos potenciais Zeta apresentaram-se menores que das outras sínteses.

Comparando-se os ácidos utilizados, o ácido clorídrico proporcionou menores tamanhos de partícula e também maiores potenciais Zeta. As altas cargas de superfície, acima de 30 mV, caracterizam uma suspensão fisicamente estável (HANS; LOWMAN, 2002).

5.6 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

A Figura 11 mostra os espectros de absorção UV-Vis das NPs de quitosana tratadas termicamente (curvas em vermelho e azul) e da quitosana solubilizada em solução ácida sem tratamento hidrotérmico (curvas em preto). Como pode ser observado, os espectros de absorção das NPs de Q-HCl (Fig. 8A) e Q-AAc (Fig. 8C) apresentaram a formação de uma banda bem definida centrada em 300 nm, enquanto que a quitosana solubilizada nas respectivas soluções acidificadas sem tratamento hidrotérmico apresentaram uma banda muito larga em torno de 285 nm. Este comportamento de absorção UV-Vis não foi identificado para as NPs de Q-AC, porém observa-se uma mudança da inclinação das curvas nesta mesma região.

Figura 11 - Espectros UV-Vis da quitosana solubilizada (concentração de ~ 5 mg/ml) e das nanopartículas (concentração de ~ 1 mg/ml). A: Síntese com ácido clorídrico; B: Síntese com ácido cítrico e C: Síntese com ácido acético.



Fonte: Da autora.

De acordo com Sathiyabama e Parthasarathy (2016), que utilizaram a espectroscopia de UV-Vis para confirmação da formação de nanopartículas de quitosana obtidas por síntese enzimática, e com Vaezifar, et al. (2013), que fizeram uso do método de gelificação iônica, a banda bem definida em torno de 300 nm está associada à formação de nanopartículas de quitosana.

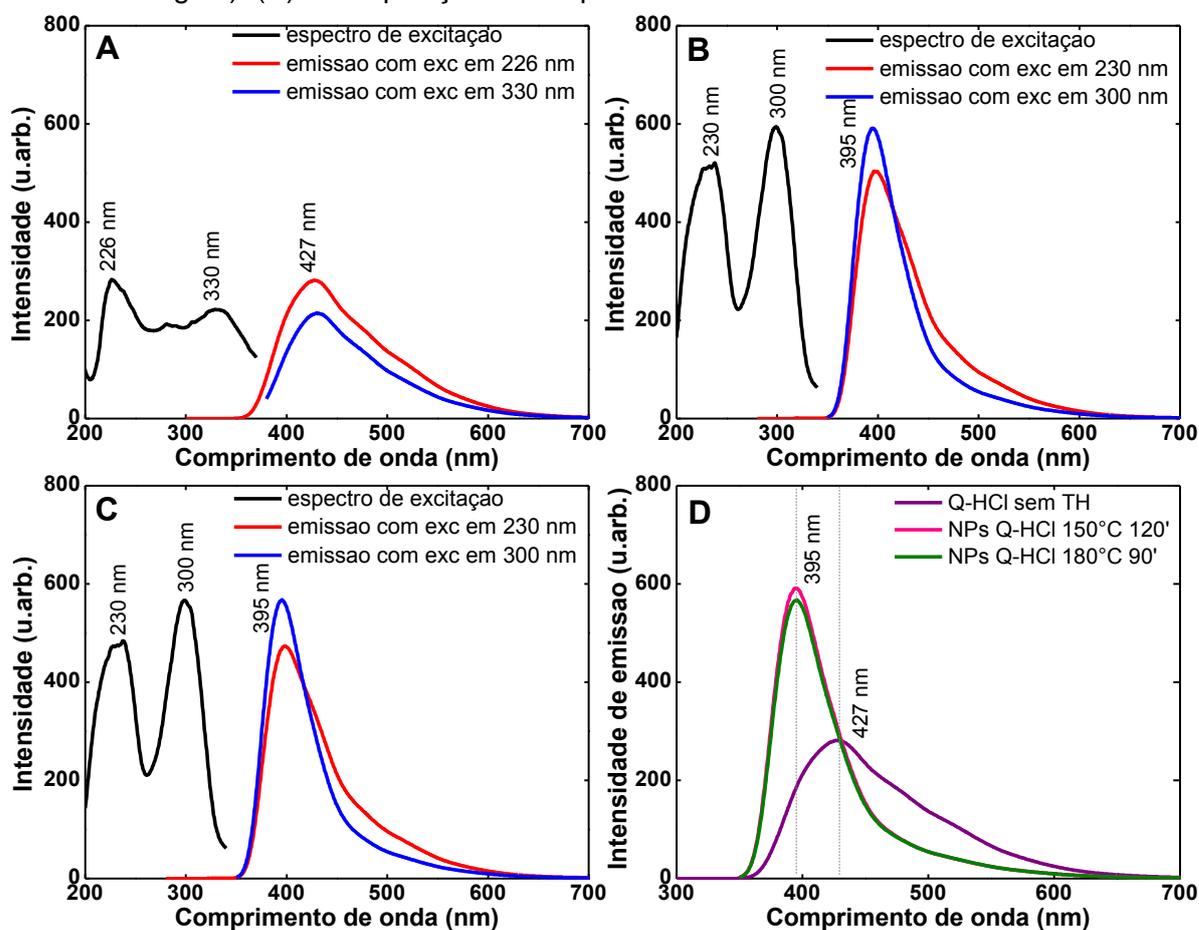
A absorção de radiação na região do ultravioleta e visível se caracteriza pela presença de grupos cromóforos, que, por sua vez, proporcionam transições dos tipos $\pi \rightarrow \pi^*$ (permitida) e $n \rightarrow \pi^*$ (proibida), típicas de compostos carbonílicos. As transições $n \rightarrow \pi^*$ tipicamente ocorrem por volta de 280 a 290 nm e, por serem proibidas, proporcionam absorções de baixa intensidade. Já transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem por volta de 188 nm. No entanto, interações entre grupos e também interferência do solvente podem influenciar as transições deslocando a absorção para menores ou maiores comprimentos de onda (PAVIA et al., 2010; SKOOG et al., 2006; VALEUR, 2001).

5.7 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Nas Figuras 12, 13 e 14 estão apresentados os espectros de excitação (curva em preto) e emissão fluorescente (curvas em vermelho e azul) da quitosana solubilizada e das NPs.

Observa-se na Figura 12 que os espectros de excitação e de emissão para a quitosana e para as NPs apresentaram mudanças nos formatos e nos comprimentos de onda de máxima intensidade. Por exemplo, no espectro de excitação, as NPs de quitosana apresentam picos em 300 nm (boa concordância com os espectros de absorção) e em 230 nm, enquanto que para a quitosana solubilizada em HCl, estes picos estão em 226 e 330 nm. Estes resultados corroboram com as medidas de absorção UV-Vis e, portanto, representa um comportamento característico da formação de NPs de quitosana.

Figura 12 - Espectros de excitação e emissão de Q-HCl. (A) quitosana solubilizada em HCl (~5 mg/ml); (B) NPs Q-HCl 150°C 120' (~1 mg/ml); (C) NPs Q-HCl 180°C 90' (~1 mg/ml). (D) Sobreposição dos espectros das maiores intensidades de emissão.

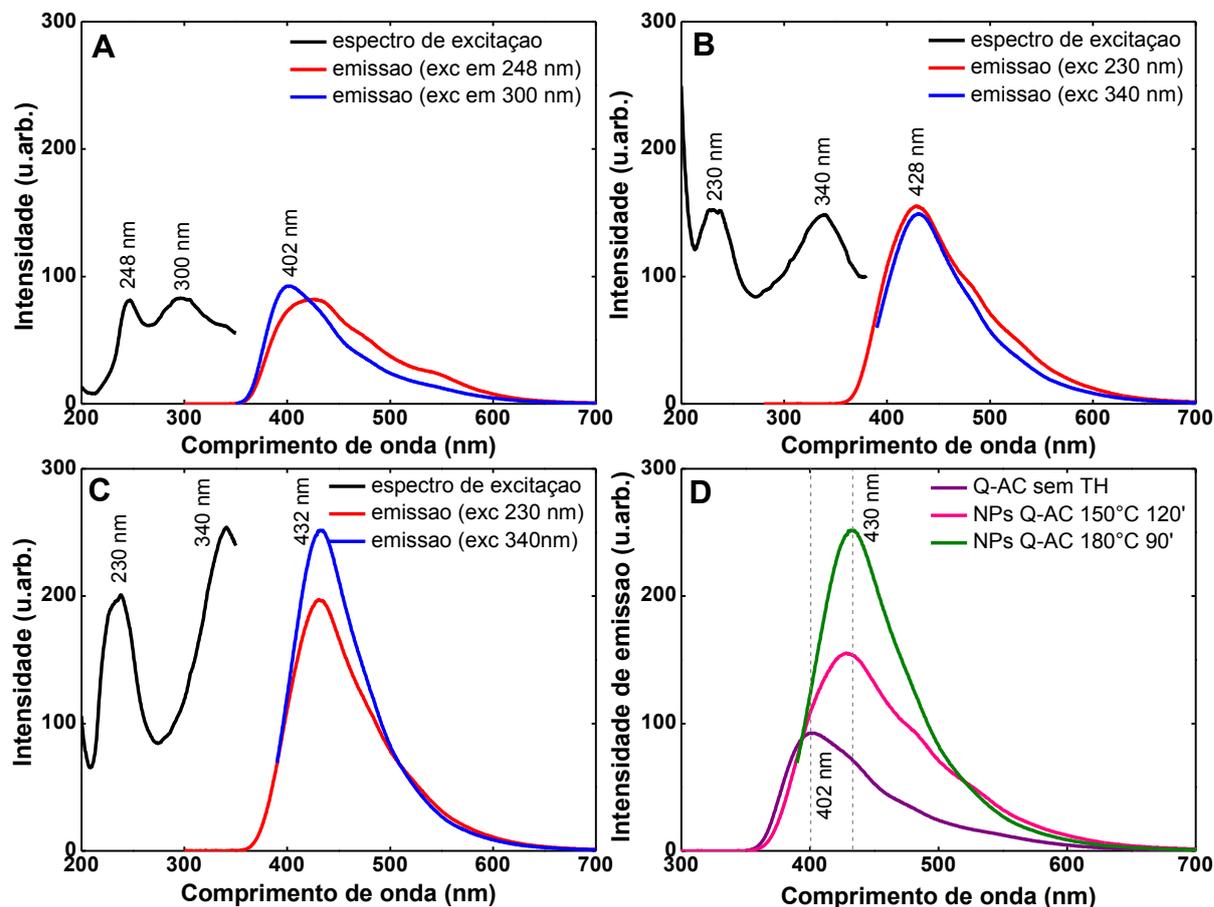


Fonte: Da autora.

Já nos espectros de emissão, a quitosana solubilizada apresenta uma fluorescência de banda larga, centrada em 427 nm. Por outro lado, as NPs (Figuras 12B e 12C) exibem uma emissão em 395 nm e uma menor largura de banda. O estreitamento do espectro de emissão indica que o estado emissivo das nanopartículas seja único (VALEUR, 2001). Outro importante resultado é que o pico de fluorescência não modificou com o comprimento de onda de excitação, como ocorre em outros estudos publicados na literatura para NPs de carbono produzidas por Yang, et al. (2012) pela carbonização da quitosana e NPs de quitosana sintetizadas por tratamento hidrotérmico reportadas por Huang, et al. (2013). Observa-se ainda, na comparação da Figura 12D, que um grande aumento da intensidade fluorescente ocorreu quando houve a formação de nanopartículas. É importante mencionar que a concentração usada nas medidas de fluorescência para a quitosana é cinco vezes maior que para as NPs. Portanto, o aumento da

intensidade de fluorescência, devido à formação das NPs, é cerca de 10 vezes maior quando comparado à quitosana solubilizada em HCl.

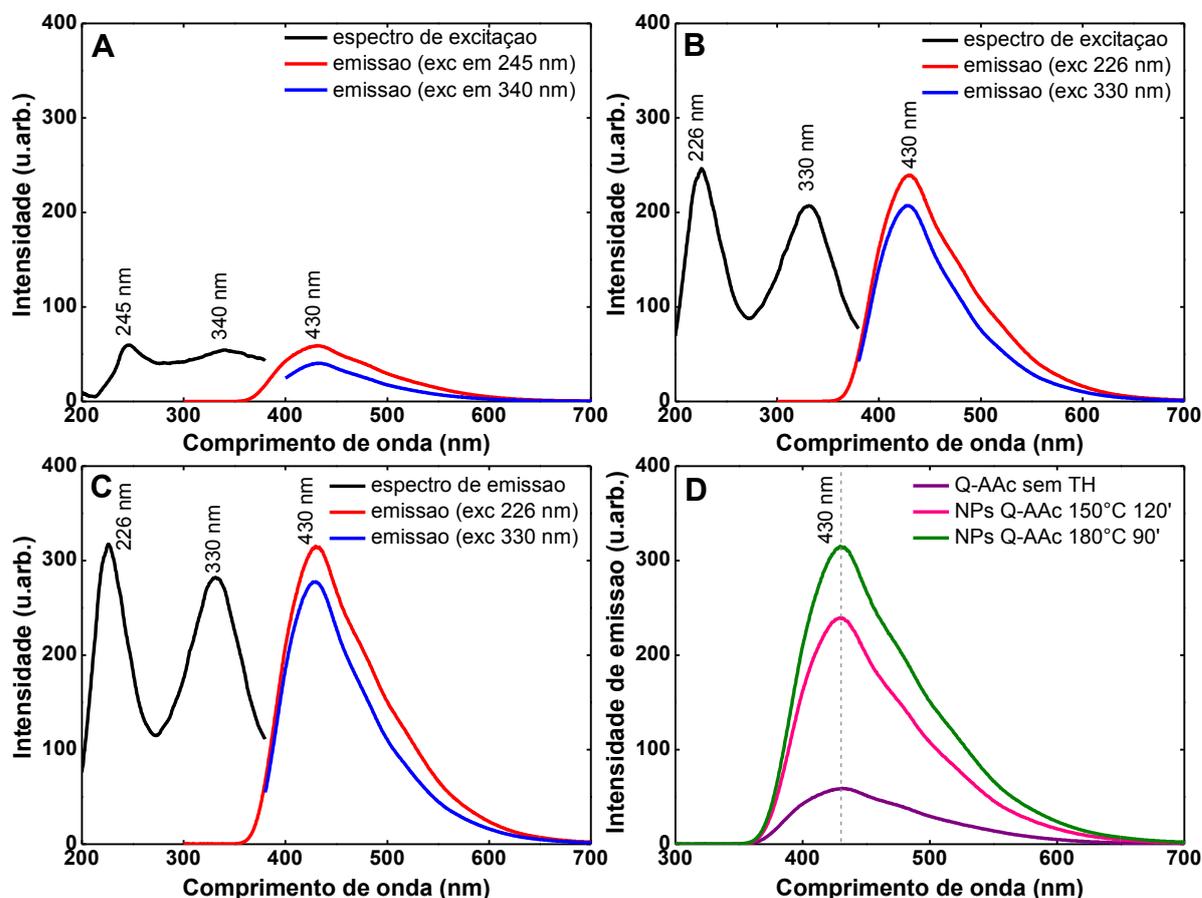
Figura 13 - Espectros de excitação e emissão de Q-AC. (A) quitosana solubilizada em AC (~5 mg/ml); (B) NPs Q-AC 150°C 120' (~1 mg/ml); (C) NPs Q-AC 180°C 90' (~1 mg/ml). (D) Sobreposição dos espectros das maiores intensidades de emissão.



Fonte: Da autora.

Os espectros de excitação e de emissão para a síntese com ácido cítrico (Figura 13) também apresentaram mudanças nos formatos e nos comprimentos de onda de máxima intensidade. Comparando-se a intensidade de emissão fluorescente (Fig. 13D) entre a quitosana solubilizada em ácido cítrico (curva roxa) e as NPs de Q-AC (curvas verde e rosa), observa-se um aumento gradual desta intensidade. No entanto, a máxima intensidade fluorescente apresentada pelas NPs Q-AC 180°C 90' é aproximadamente igual à intensidade exibida pela quitosana solubilizada em HCl sem TH (Fig. 12D).

Figura 14 - Espectros de excitação e emissão de Q-AAc. (A) quitosana solubilizada em AAC (~5 mg/ml); (B) NPs Q-AAc 150°C 120' (~1 mg/ml); (C) NPs Q-AAc 180°C 90' (~1 mg/ml). (D) Sobreposição dos espectros das maiores intensidades de emissão.



Fonte: Da autora.

Na síntese com ácido acético apresentada na Figura 14, a intensidade de fluorescência também foi intensificada, e os espectros apresentaram mudanças em seu formato. Diferente das outras sínteses, as emissões quando utilizado ácido acético ocorreram em 430 nm.

O aumento da intensidade fluorescente pode estar associado à formação de nanopartículas pelas cadeias de quitosana que foram despolimerizadas (HUANG et al., 2013). A origem da fotoluminescência em NPs de quitosana ainda é desconhecida, porém a fluorescência também pode ser influenciada por imperfeições ou formação de grupos emissivos na superfície das nanopartículas que as levam à emissão YANG et al., 2012).

5.7.1 Eficiência Quântica de Fluorescência

A eficiência quântica das amostras foi determinada pelo método que utiliza como amostra fluorescente padrão a 2-aminopiridina ($\Phi=60\%$) (EATON, 1988; RUSAKOWICZ; TESTA, 1968). Os valores de eficiência quântica estão apresentados na Tabela 5, bem como os valores de máxima intensidade fluorescente e o comprimento de onda de máxima emissão. No Anexo C estão apresentados os gráficos das funções de reta utilizados no cálculo de Φ .

Tabela 5 - Eficiência quântica.

Amostras	Máxima intensidade fluorescente	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)	Φ (%)
Q-HCl sem TH	281,76	427	0,02
NP Q-HCl 150°C 120'	590,81	395	1,5
NP Q-HCl 180°C 90'	567,66	395	1,1
Q-AC sem TH	92,40	402	0,02
NP Q-AC 150°C 120'	155,32	428	0,2
NP Q-AC 180°C 90'	251,68	432	0,2
Q-AAc sem TH	58,90	430	0,06
NP Q-AAc 150°C 120'	239,77	430	0,3
NP Q-AAc 180°C 90'	314,89	430	0,5

Fonte: Da autora.

Observa-se que as amostras que apresentaram as maiores eficiências quânticas utilizando água como solvente foram as de Q-HCl. Este aumento foi de 75 vezes. As amostras de Q-AC e Q-AAc tratadas hidrotermicamente também apresentaram um aumento da eficiência quântica, no entanto este aumento foi substancialmente menor, de 10 vezes para Q-AC submetidas ao tratamento hidrotérmico e de aproximadamente 8 vezes para Q-AAc tratadas hidrotermicamente.

É importante ressaltar que a determinação da eficiência quântica foi realizada com as nanopartículas resuspensas em água, com pHs entre 4 e 5. Yan, et al. (2015) relatou que a fluorescência diminui consideravelmente em solventes como metanol e água.

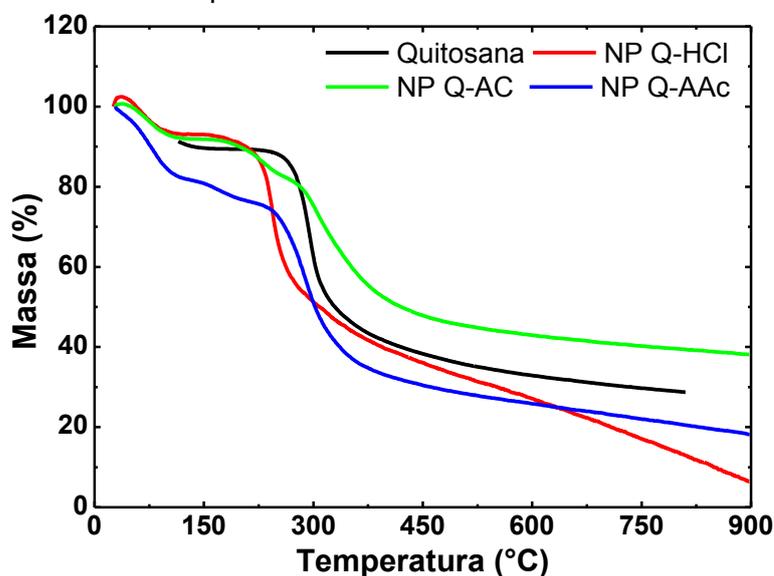
5.8 ANÁLISE TÉRMICA

5.8.1 Termogravimetria (TG)

A análise térmica por termogravimetria é de grande importância para sistemas poliméricos, por meio dela é possível observar a variação da massa em função do tempo ou temperatura quando a amostra é submetida a temperaturas pré-estabelecidas. Desta forma, pode-se avaliar as alterações ocorridas na massa das substâncias, a faixa de temperatura na qual o material adquire estabilidade em relação a sua composição química, a temperatura em que começa a se decompor, além de observar reações como oxidação, combustão e desidratação (CANEVAROLO JR., 2004).

A Figura 15 mostra as curvas TG da quitosana em pó e das nanopartículas. Foram submetidas à análise somente as nanopartículas obtidas pela condição de 150°C por 120 minutos.

Figura 15 - Gráfico TG da quitosana em pó e das nanopartículas.



Fonte: Da autora.

Nas curvas TG, observa-se dois eventos térmicos com perda de massa para a quitosana (curva em preto) e para as NPs sintetizadas com ácido clorídrico e ácido cítrico (curvas em vermelho e azul). Estes eventos correspondem respectivamente à desidratação e decomposição do material.

A curva da quitosana em pó indica que a amostra continha cerca de 10% de água fisicamente adsorvida, que é evaporada em temperaturas relativamente baixas, de 25 a 120°C. Já o segundo evento, referente à decomposição do material, aparece entre 250 a 350°C, com máximo em 295°C, através do qual se observa uma perda de aproximadamente 55% da massa da amostra, gerando um resíduo carbonizado ao final da análise. A decomposição do material envolve os seguintes processos: despolimerização das cadeias da quitosana, decomposição dos anéis pirrolídicos por desidratação e desaminação, e, por fim, a abertura do anel (ZAWADZKI; HACZMAREK, 2010).

Para as nanopartículas sintetizadas com ácido clorídrico, ácido cítrico e ácido acético, os eventos térmicos apresentaram-se semelhantes, exceto que, para as NPs Q-AC e NPs Q-AAc, a decomposição ocorreu em mais de um evento. Todas as amostras apresentaram desidratação por volta de 70°C, com perdas de massa de 7% para as NPs Q-HCl, 9% para as NPs Q-AC e de 18% para as NPs Q-AAc. Com perda de massa de 50%, a decomposição das NPs Q-HCl ocorreu próximo a 243°C. Já das NPs Q-AC, a decomposição compreendeu uma perda de massa de 10% por volta de 230° seguido de outra redução de 35% da massa próxima a 303°C. Esta decomposição mais prolongada observada nas NPs Q-AC indica o aumento de ligações cruzadas nas nanopartículas de quitosana, proporcionado pelo ácido cítrico. No entanto, a primeira degradação ocorre em menor temperatura (230°C) que a degradação das outras amostras (295°C para a quitosana, 245°C para as NPs Q-HCl), que, segundo Salam et al. (2010), se deve à decomposição do ácido cítrico, que apresenta picos DTG em 191°C e 210°C. Os dois eventos relacionados à decomposição das NPs Q-AAc ocorrem em 170°C, com perda de massa de 6%, e em 290°C, com redução de 42% da massa, comportamento também obtido por Nunthanid et al. (2004), que produziu acetato de quitosana pela técnica de spray-dried.

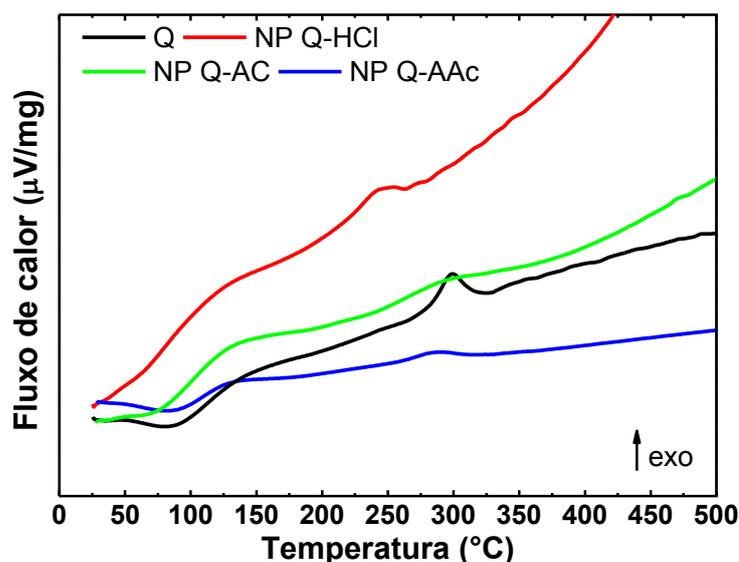
Resumidamente, a análise térmica indicou que as amostras continham até 10% de água adsorvida, exceto para as NPs sintetizadas com ácido acético (18%). Esta água foi evaporada a temperaturas relativamente baixas (abaixo de 120°C), indicando adsorção física e/ou participação em ligações de hidrogênio. A água pode se ligar a dois grupos polares da estrutura da quitosana, hidroxila e amina (CYPRIANO NETO et al., 2005). Os eventos observados nas curvas TG são

semelhantes aos obtidos por Santos et al. (2003), Nunthanid et al. (2004), Salam et al. (2010) e Cervera et al. (2011).

5.8.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC das amostras, apresentadas na Figura 16, indicam suavemente dois eventos térmicos. Primeiramente, um evento endotérmico entre 30 e 120°C, relacionado à perda de água. A quitosana em pó apresenta um pico exotérmico bem definido próximo a 300°C, que mostra correlação com os eventos observados na TG. As nanopartículas mostram o início de um evento exotérmico por volta de 250°C, sendo que as NPs Q-HCl apresentam este pico exotérmico definido (CERVERA et al., 2011; SALAM et al., 2010).

Figura 16 - Gráfico DSC da quitosana em pó e das nanopartículas.

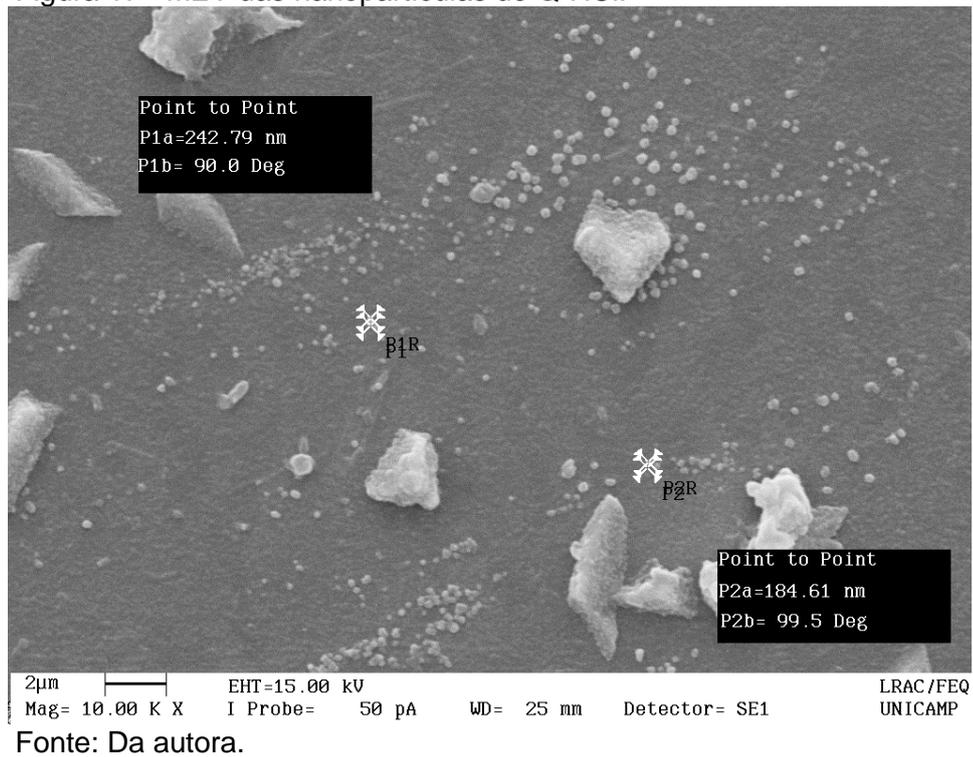


Fonte: Da autora.

5.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

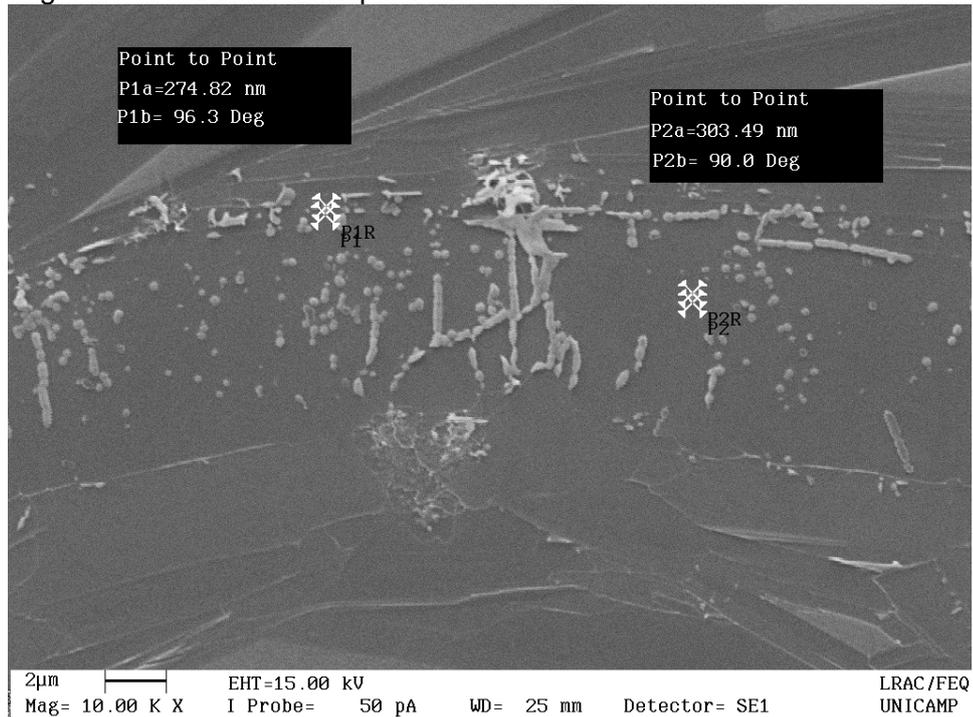
As imagens de MEV estão apresentadas nas Figuras 17 a 19. A formação de nanopartículas foi confirmada, porém com particularidades para cada tipo de ácido utilizado nas sínteses.

Figura 17 - MEV das nanopartículas de Q-HCl.



Através da Figura 17, observa-se que a síntese com ácido clorídrico proporciona nanopartículas esféricas e com boa dispersão. Os tamanhos estimados das nanopartículas, embora um pouco superiores aos obtidos pela análise de DLS, estão bem correlacionados com o mesmo (diâmetro médio de 147 nm).

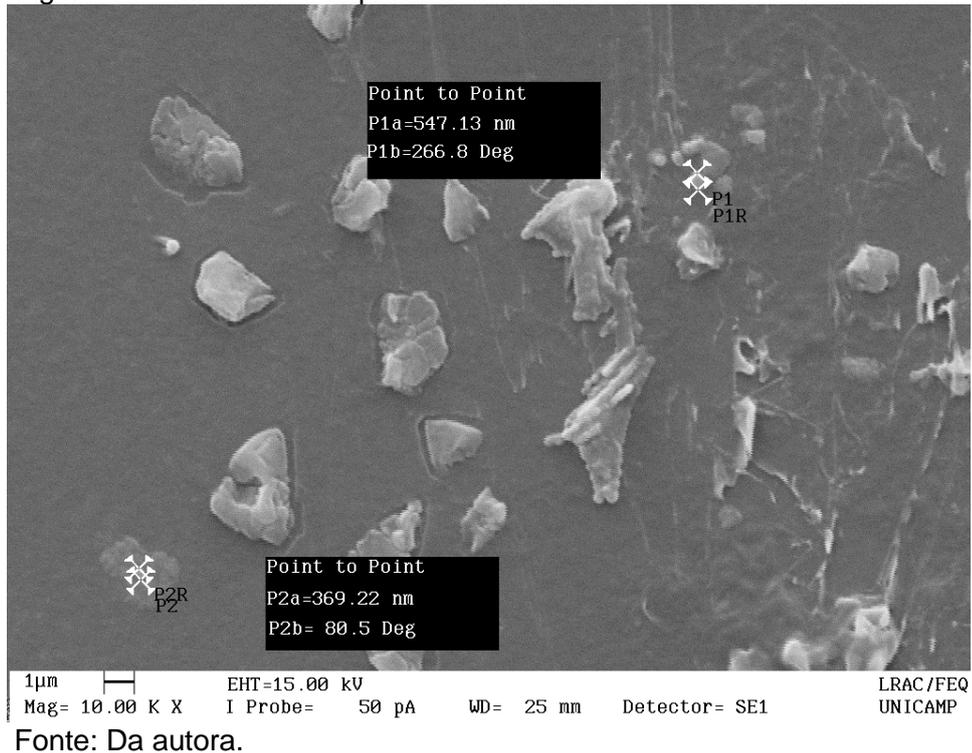
Figura 18 - MEV das nanopartículas de Q-AC.



Fonte: Da autora.

Já na micrografia das nanopartículas sintetizadas com ácido cítrico (FIGURA 18), também é possível observar a formação de partículas de formato esférico, no entanto as partículas maiores diferem dos aglomerados observados na Figura 17, pois apresentam maior aderência e superfícies mais lisas. Novamente, os tamanhos das nanopartículas apresentam boa relação com os dados de DLS, diâmetros médios de 290 nm.

Figura 19 - MEV das nanopartículas de Q-AAc.



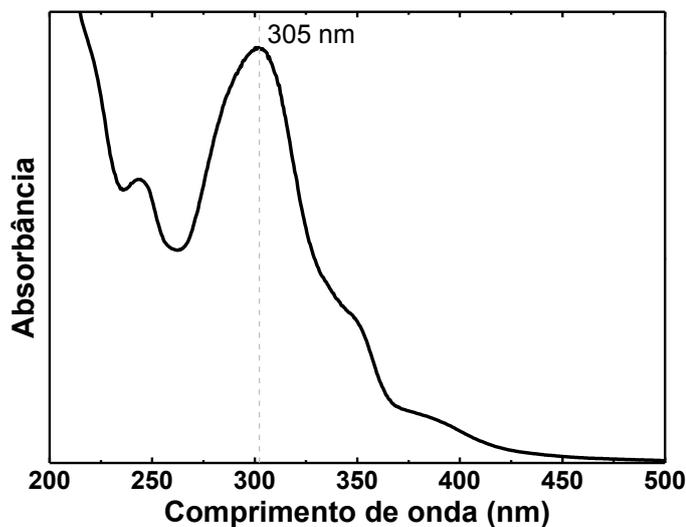
Já a síntese com ácido acético proporcionou partículas maiores com formatos irregulares. Observa-se na Figura 19 a presença de algumas partículas menores que 600 nm, porém em minoria, havendo a predominância de partículas/aglomerados maiores que 1 µm, que também foram apresentados na análise de DLS (diâmetros médios de 1183 nm).

Em geral, a formação de partículas com formatos mais uniformes foi proporcional à constante de dissociação do ácido utilizado na síntese. O emprego do ácido mais forte (HCl) resultou em nanopartículas menores e de maior esfericidade.

5.10 COMPRIMENTO DE ONDA REPRESENTANTE DO MTX

Com o objetivo de observar o melhor comprimento de onda para a determinação analítica do MTX em solução aquosa foi realizada varredura por espectroscopia de UV-Vis, apresentada na Figura 20.

Figura 20 - Espectro de varredura UV-Vis do MTX (0,1 mg/ml).



Fonte: Da autora.

O comprimento de onda selecionado para determinação do MTX foi de 305 nm, que está em concordância com estudos de Hashad, et al. (2016) e Erinki, et al. (2015).

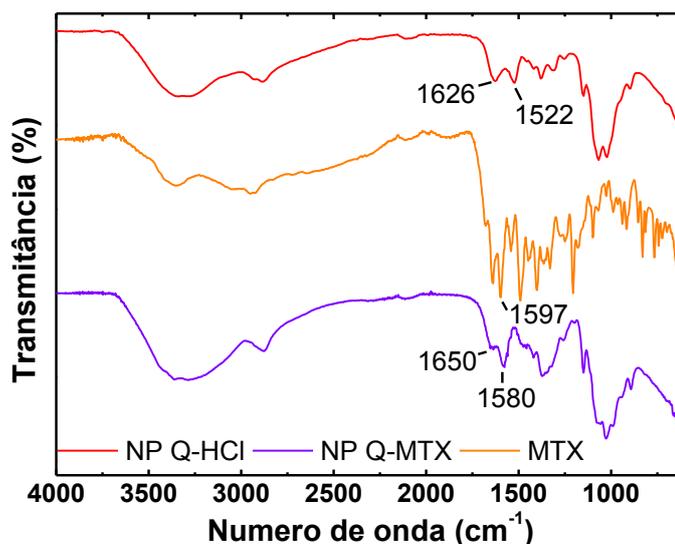
5.10 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%)

A eficiência de incorporação do MTX às nanopartículas de quitosana, calculada através da Equação 6, foi de $72,90 \pm 0,14\%$. Hashad et al. (2016) obteve a incorporação de 73,38% de MTX às nanopartículas de Q-TPP (quitosana-tripolifosfato) utilizando o método de gelificação iônica, em que o fármaco foi incorporado durante a síntese das nanopartículas, resultando em tamanhos de 232,6 nm com PDI de 0,195 e carga de superfície de +18,4 mV.

5.11 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS NPs Q-MTX

A análise de FTIR também foi utilizada para confirmar a interação do fármaco MTX às nanopartículas de quitosana. Os espectros de FTIR dos componentes isolados (nanopartículas de quitosana e MTX) e da conjugação Q-MTX estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Espectros FTIR de Q-HCl, MTX e Q-MTX.



Fonte: Da autora.

No espectro do MTX é possível identificar a presença das principais bandas características do fármaco, resumidas na Tabela 6, tais como: banda de absorção associada ao estiramento O-H com sobreposição de estiramento N-H em 3355 cm^{-1} , ligação C-H da amina secundária (1330 cm^{-1}), estiramento C-O (1206 cm^{-1}) e C=O (1638 cm^{-1}). O estiramento referente ao grupamento amina N-H ocorre em 1597 cm^{-1} e as bandas típicas de anel aromático, com estiramento C=C ocorrem em 1489 cm^{-1} e 1399 cm^{-1} (FULIAS et al., 2014; PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

O espectro das nanopartículas de quitosana incorporadas com MTX (NPs Q-MTX) mostra uma diminuição da intensidade da banda em 1650 cm^{-1} , assim como deslocamento, o qual também é observado para a banda em 1580 cm^{-1} , em comparação com as bandas em 1626 cm^{-1} (amida I) e 1522 cm^{-1} (amida II) das nanopartículas de quitosana (NPs Q-HCl). Esta modificação sugere a interação entre quitosana e MTX, indicando a presença do fármaco nas nanopartículas através da interação iônica envolvendo os grupos carboxila do MTX e grupos amino da quitosana (HASHAD et al., 2016; LUO et al., 2014).

Tabela 6 - Principais bandas identificadas nos espectros de FTIR e seus respectivos grupos funcionais.

Região de absorção (cm ⁻¹)	Atribuição	MTX (cm ⁻¹)	NP Q-HCl (cm ⁻¹)	NP Q-MTX (cm ⁻¹)
3400-3300	O-H v			
3475-3150	N-H v	3355	3320	3310
1670-1600	C=O v	1638	-	-
1660-1540	N-H v	1597	1626/1522	1650/1580
1342-1266	C-N v	1330	-	-
1400-1200	C-O v	1206	-	-
	C=C v	1489/1399	-	-
1020-1200	C-O-H v	-	1022/1067	1025

*v: estiramento; $\bar{\nu}$: dobramento.

Fonte: Da autora.

5.12 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA DAS NPS Q-MTX

O diâmetro hidrodinâmico médio apresentado pelas nanopartículas de quitosana incorporadas com MTX foi de $272,9 \pm 7,1$ nm (PDI $0,47 \pm 0,07$). Os tamanhos previamente obtidos para as NPs sintetizadas com ácido clorídrico na condição de 180°C por 120 minutos (NP Q-HCl 180°C 120') foi de $147,3$ nm (PDI $0,24$), indicando um aumento dos tamanhos das partículas e também maior dispersão de tamanhos.

Este resultado está em concordância com outros estudos que relacionam a massa molecular relativamente alta do MTX incorporado às nanopartículas ao aumento dos tamanhos (HASHAD et al., 2016; WU et al., 2005).

As NPs Q-MTX apresentaram carga de superfície positiva, com potencial Zeta de $+37,1 \pm 2,5$ mV (em pH 2,42), indicando a presença de grupamento amino livres protonados. O potencial Zeta das nanopartículas sem incorporação do fármaco era de $+44,7$ mV. Desta forma, observa-se uma diminuição do potencial Zeta devido à interação do MTX com a quitosana, porém as altas cargas de superfície ainda caracterizam um sistema fisicamente estável.

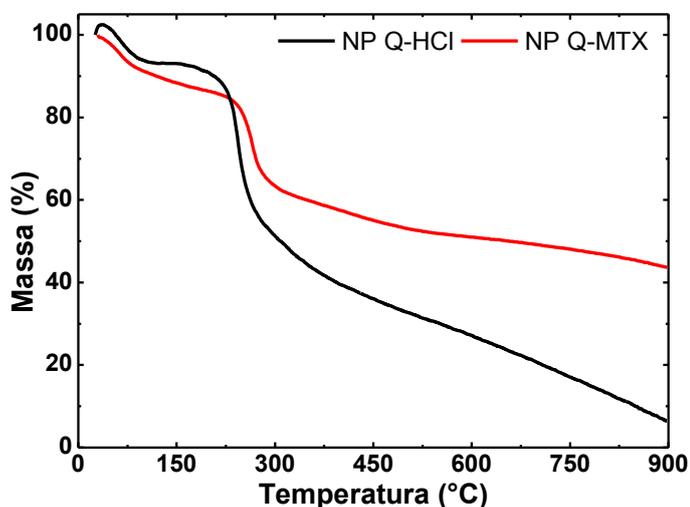
Wu et al. (2009) também obteve potenciais Zeta similares (próximos a $+30$ mV) para nanopartículas de quitosana-MTX-TPP sintetizadas pelo método de gelificação iônica.

5.13 ANÁLISE TÉRMICA DAS NPS Q-MTX

5.13.1 Termogravimetria (TG)

A Figura 22 mostra as curvas TG das nanopartículas de quitosana sintetizada com ácido clorídrico, a fim de comparação, e destas nanopartículas incorporadas com MTX.

Figura 22 - Gráfico TG das nanopartículas de quitosana e das nanopartículas incorporadas com MTX.



Fonte: Da autora.

Através da comparação entre as curvas TG, observa-se que as nanopartículas Q-MTX apresentam uma perda de 5% da massa próximo aos 65°C, referente à desidratação do material. O próximo evento térmico, relacionado à decomposição, ocorre aos 266°C, com perda de 35% da massa, apresentando ainda, ao final da análise, 57% da massa inicial de nanopartículas Q-MTX. Em contrapartida, as nanopartículas sem a incorporação do fármaco, apresentaram decomposição em temperatura mais baixa, por volta de 245°C, chegando ao fim da análise com 6% da massa inicial.

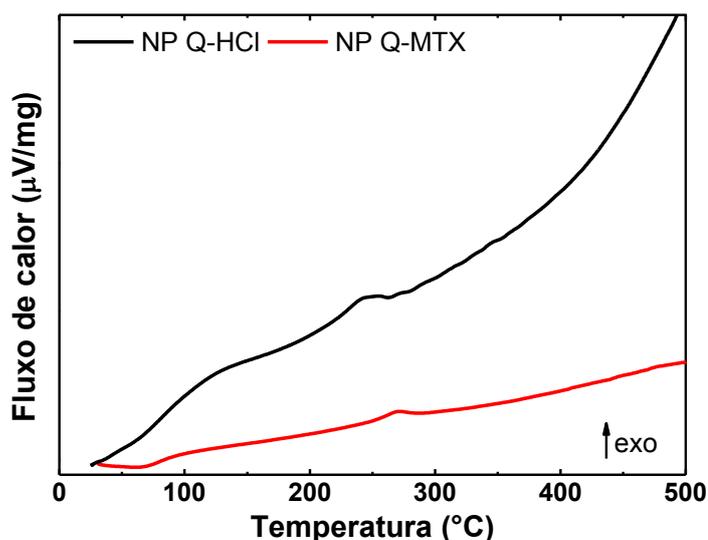
Esta alteração nos eventos térmicos apresentados pelas NPs Q-MTX pode estar relacionada com a interação da quitosana com o fármaco. Todavia, considerando que esta diferença tenha sido pequena, pode-se inferir que o processo de incorporação não afetou a estrutura e propriedades das nanopartículas de

quitosana (NALLAMUTHU; DEVI; KHANUM, 2015). O aumento da temperatura de decomposição e a maior taxa de resíduo apresentadas pelas NPs Q-MTX indicam ainda um aumento de ligações cruzadas no material (SALAM et al., 2010).

5.13.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC das nanopartículas com e sem incorporação do fármaco estão apresentadas na Figura 23. Observa-se na curva DSC das NPs Q-MTX dois eventos térmicos similares aos apresentados pelas nanopartículas sintetizadas com HCl. Um evento endotérmico próximo a 62°C e posteriormente um evento exotérmico por volta de 270°C. As nanopartículas sem o fármaco (Q-HCl) apresentam os eventos endotérmicos e exotérmicos por volta de 65°C e 250°C, respectivamente.

Figura 23 - Gráfico DSC das nanopartículas de quitosana e das nanopartículas incorporadas com MTX.



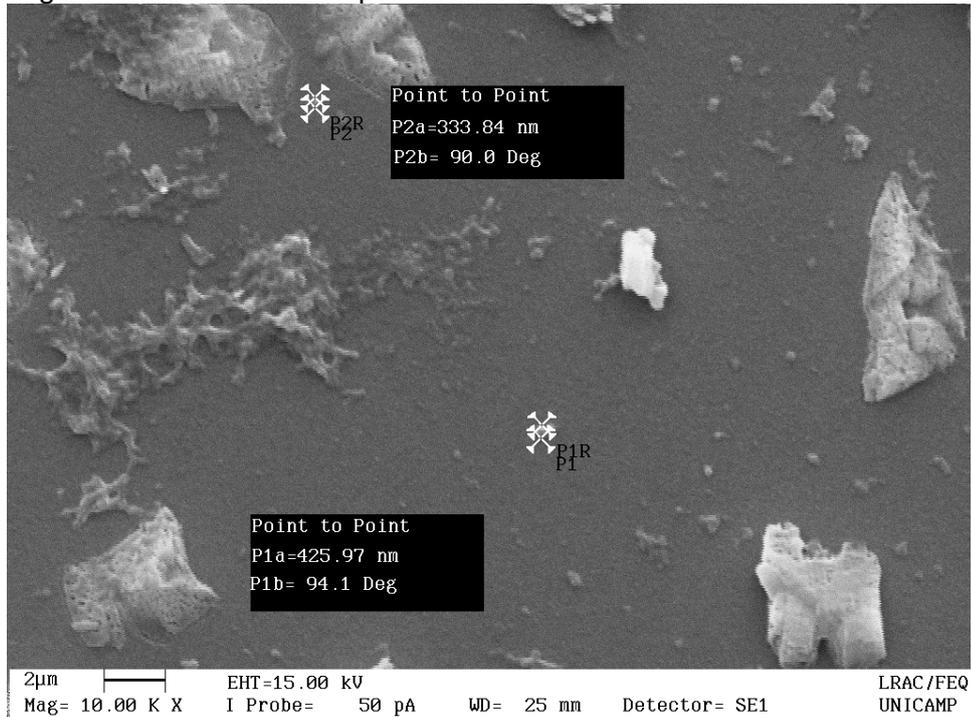
Fonte: Da autora.

Os eventos observados na análise DSC apresentam grande correlação com a análise TG e, mais uma vez, indicam a presença de ligações cruzadas advindas da incorporação do MTX, relacionada ao pico de degradação aos 270°C (HASHAD et al., 2016; MALAIYA; YADAV, 2018).

5.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS NPs Q-MTX

A Figura 24 apresenta a micrografia das nanopartículas incorporadas com MTX.

Figura 24 - MEV das nanopartículas de Q-MTX.



Fonte: Da autora.

Observa-se que a incorporação do fármaco provocou uma alteração nos formatos das partículas e também maior variedade de tamanhos. Sugere-se que a maior aglomeração da amostra Q-MTX, em comparação com as nanopartículas sem o fármaco (NPs Q-HCl), tenha relação com a diminuição do potencial zeta e consequente diminuição da repulsão entre as nanopartículas.

6 CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das soluções acidificadas na formação de nanopartículas de quitosana com eficiência quântica potencializada, bem como incorporar metotrexato às nanopartículas. Os resultados obtidos apresentaram-se satisfatórios e pelo conjunto de dados pode-se concluir:

- (i) O tratamento hidrotérmico foi efetivo na diminuição do tamanho das partículas de quitosana, sendo que a síntese com ácido mais forte (HCl) proporcionou os menores tamanhos de partícula;
- (ii) As análises de FTIR indicaram que houve interação entre os componentes e que a estrutura da quitosana foi mantida;
- (iii) Quanto às análises das propriedades óticas do material, constatou-se que, com a diminuição dos tamanhos das partículas a intensidade fluorescente das partículas de quitosana é aumentada, o que foi confirmado pela determinação da eficiência quântica;
- (iv) A incorporação do MTX às nanopartículas de quitosana foi efetiva, o que também foi observado pela análise de FTIR;
- (v) A introdução de ligações cruzadas proporcionou maior estabilidade térmica às nanopartículas de Q-MTX em comparação com as nanopartículas de quitosana sintetizadas com HCl (NP Q-HCl);
- (vi) As fotomicrografias permitiram observar menores diâmetros de partículas e formatos com maior uniformidade para as nanopartículas sintetizadas com ácidos de maiores constantes de dissociação, ácido clorídrico e ácido cítrico.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- (i) Analisar a estabilidade coloidal das nanopartículas em vários pHs;
- (ii) Fazer estudo da fluorescência das nanopartículas incorporadas com metotrexato;
- (iii) Analisar o perfil de liberação do fármaco;
- (iv) Avaliar a biocompatibilidade dos materiais por meio de ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, p. 1115-1130, 2013.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5-28, 2004.
- ALEXIS, F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.
- ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203-230, 2009.
- AZADI, A. et al. Preparation and optimization of surfactant-treated methotrexate-loaded nanogels intended for brain delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 462-471, 2012.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BASUMALLICK, S. et al. Hydrothermally treated chitosan spontaneously forms water-soluble spherical particles stable at a wide pH range. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, n.15, p.751-758, 2016.
- BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogel for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, p.83-99, 2010.
- BODNAR, M.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2521-2527, 2005.
- BOF, M. J. et al. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. **Food hydrocolloids**, v.51, p.281-294, 2015.
- BRAUN, B., DORGAN, J. R. Single-step method for the isolation and surface functionalization of cellulosic nanowhiskers. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 334–341, 2009.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. 17-71, 2007.
- BYRAPPA, K.; ADSCHIRI, T. Hydrothermal technology for nanotechnology. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 53, p. 117-166, 2007.
- CALVO, P. C. et al. Novel hydrophilic chitosans-polyethylene oxide nanoparticles as protein carrier. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.

- CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e aplicações de quitosana. **Revista Processos Químicos**, v.1, n.2, p.9-20, 2007.
- CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.
- CERVERA, M. F. et al. Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosans acid salts. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 2, p. 637-649, 2011.
- CHEN, P. H. et al. Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 27, n.1, p. 23-28, 2007.
- CHOI, W. S. et al. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 78, p. 533-538, 2002.
- CORMODE, D. P. et al. Nanotechnology in medical imaging. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 7, p. 992-1000, 2009.
- CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- DEMARGER-ANDRE, S.; DOMARD, A. Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 211-219, 1994.
- DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. **Jornal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, p.184-191, 2013.
- DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. **Die Makromoleculare Chemie**, v. 186, p. 1671-1677, 1985.
- DRUMMEN, G. P. C. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques – illuminating biological and biomedical research. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14067-14090, 2012.
- EATON, D. F. Reference materials for fluorescence measurements. **Pure and Applied Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1107-1114, 1988.
- EKINCI, M. et al. Methotrexate loaded chitosan nanoparticles: preparation, radiolabeling and in vitro evaluation for breast cancer diagnosis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 107-113, 2015.
- EL-SHABOURI, M. H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 101-108, 2002.
- ERBACHER, P. et al. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. **Pharmaceutical Research**, v.5, n.9, p.1332-1339, 1998.

ERRINGTON, N. et al. Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.15, n.12, p.113-117, 1993.

FEYNMAN, R. P There's plenty of room at the bottom. **Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 22-36, 1960.

FONSECA, A. C. M. **Processos de obtenção e caracterização físico-química de quitinas e quitosana extraídas dos rejeitos da indústria pesqueira da região de Cananéia-SP**. 2016. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

FULIAS, A. et al. Thermoanalytical and spectroscopic study on methotrexate active substance and tablete. **Digest Journal of Nanomaterials and Bioinstruments**, v. 9, n. 1, p. 93-98. 2014.

GAIES, E. et al. Methotrexate side effects: review article. **Journal of Drug Metabolism & Toxicology**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2012.

GIRATA, A. K. et al. Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo prata. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18, 2011, Caxias. **Anais...** Caxias: 2011. p. 1-6.

GOMES, L. P.; PASCHOALIN, V. M. F.; AGUILA, E. M. D. Chitosan nanoparticles: production, physicochemical characteristics and nutraceutical applications. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 387-409, 2017.

HASHAD, R. A. et al. Methotrexate loading in chitosan nanoparticles at novel pH: response surface modeling, optimization and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 630-639, 2016.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57-64, 2008.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319-327, 2002.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1722, p. 22-29, 2005.

HEJAZI, R; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 3ed. Rockford: Academic Press, 2013.

HUANG, H. et al. Enhanced fluorescence of chitosan based on size change of micelles and application to directly selective detecting Fe³⁺ in human serum. **Biosensors and bioelectronics**, v. 42, p. 539-544, 2013.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1326-1331, 1998.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials – a short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 227-232, 2010.

JIA, Z.; SHEN, D. Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 393-396, 2002.

JIAYIN, Z.; JIANMIN, W. Preparation and characterization of the fluorescent chitosan nanoparticles probe. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 34, n. 11, p. 1555-1559, 2006.

JOHN, A. A. et al. Folic acid decorated chitosan nanoparticles and its derivatives for the delivery of drugs and genes to cancer cells. **Current Science**, v. 113, n. 8, p. 1530-1542, 2017.

KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 420-430, 2009.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2 ed. Nova York: Springer, 1999.

LENCER, W. I. et al. FITC-dextran as a probe for endosome function and localization in kidney. **The American Journal of Physiology**, v. 258, p. 309-317, 1990.

LUO, F. et al. Validation of a Janus role of methotrexate-based PEGylated chitosan nanoparticles in vitro. **Nanoscale Research Letter**, v. 9, n. 1, p. 363-376, 2014.

MANDAL, K. et al. Functionalized chitosan with self-assembly-induced and subcellular localization-dependent fluorescence 'Switch on' property. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 5774-5784, 2018.

MAKADIA, H. K., SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377-1397, 2011.

MALAIYA, A.; YADAV, A. K. Hyaluronic acid anchored nanoparticulate carrier for delivery of methotrexate. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 899-907, 2018.

MÉRIAN, J. et al. Fluorescent nanoprobe dedicated to *in vivo* imaging: from preclinical validations to clinical translation. **Molecules**, v. 17, p. 5564-5591, 2012.

MIN, L. et al. Fabrication of chitosan nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics and their applications in long-term live cell imaging. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 34, n. 9, p. 767-771, 2013.

MITRA, S. et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 74, p. 317-323, 2001.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NALLAMUTHU, I.; DEVI, A.; KHANUM, F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 203-211, 2015.

NETO, C. G. T. et al. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.

NUNTHANID, J. et al. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 15-26, 2004.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

ORIENTI, I. et al. Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 238, p. 51-59, 2002.

OSMAN, Z.; AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 993-999, 2003.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PLANCK, M. Ueber das Gesetz der Energieverteilung im Normalspectrum. **Annalen Der Physik**, v. 309, p. 553-563, 1901.

QIN, C. et al. The physicochemical properties and antitumor activity of cellulase-treated chitosan. **Food Chemistry**, v. 84, p. 107-115, 2004.

RAHMAN, L. K. A.; CHHABRA, S. R. The chemistry of methotrexate and its analogues. **Medicinal Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 95-155, 1988.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Macromolecules**, v. 15, p. 281-285, 1993.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Review**, v. 35, p. 583-592, 2006.

ROMANAZZI, G. et al. Effect of chitosans dissolved in diferente acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. **The American Phytopathological Society**, v. 99, n. 9, p.1028-1036, 2009.

ROY, K. et al. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. **Nature Medicine**, v. 5, p. 387-391, 1999.

RUSAKOWICZ, R.; TESTA, A. C. 2-aminopyridine as a standard for low-wavelength spectrofluorimetry. **Journal of Physical Chemistry**, v. 72, n. 7, 1968.

SALAM, A. et al. Synthesis and characterization of starch citrate-chitosan foam with superior water and saline absorbance properties. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 6, p. 1453-1459, 2010.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosana comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SATHIYABAMA, M.; PARTHASARATHY, R. Biological preparation of chitosan nanoparticles and its in vitro antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 321-325, 2016.

SHIN-YA, Y. et al. Effects of N-acetylation degree on N-acetylated chitosan hydrolysis with commercially available and modified pectinases. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 85-88, 2001.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: a state of the art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46-58, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7 ed. New York: John Willey & Sons, 2005.

SINGH, R.; LILLARD JR., J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, p. 215-223, 2009.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, São Paulo-SP, 2006.

SONG, Y. C. et al. Fluorescent carbon nanodots conjugated with folic acid for distinguishing folate-receptor-positive cancer cells from normal cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 12568-12573, 2012.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering; a review. **Biomaterials**, v. 21, p. 2589-2598, 2000.

TAHIR, N. et al. Development and optimization of methotrexate-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, p. 156-168, 2017.

TAVARES, I. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 2011. 54f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.

TOMMERAAS, K. et al. Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerization of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

TRAN, N. T. T. et al. Synthesis of methotrexate-conjugated gold nanoparticles with enhanced cancer therapeutic effect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 175-180, 2013.

VAEZIFAR, S.; RAZAVI, S.; GOLOZAR, M. A.; KARBASI, S.; MORSHED, M. KAMALI, M. Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. **Journal of cluster science**, v. 24, n. 3, p. 891-903, 2013.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Wiley-VCH Verlag, 2001.

VARUM, K. M.; OTTOY, M. H.; SMIDSRØD, O. Acid hydrolysis of chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 89-98, 2001.

VAZ, R. et al. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1366-1373, 2015.

VENTOLA, C. L. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, n. 12, p. 742-755, 2017.

ZAWADZKI, J.; HACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosans in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 394-400, 2010.

YAN, J. et al. Unexpected fluorescence from polymers containing dithio/amino-succinimides. **Polymer Chemistry**, v. 6, p. 6133-6139, 2015.

YANG, J.; WEBB, A. R.; AMEER, G. A. Novel citric acid-based biodegradable elastomers for tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 16, n. 6, p. 511-516, 2004.

YANG, Y. et al. One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan. **Chemical Communications**, v. 48, p. 380-382, 2012.

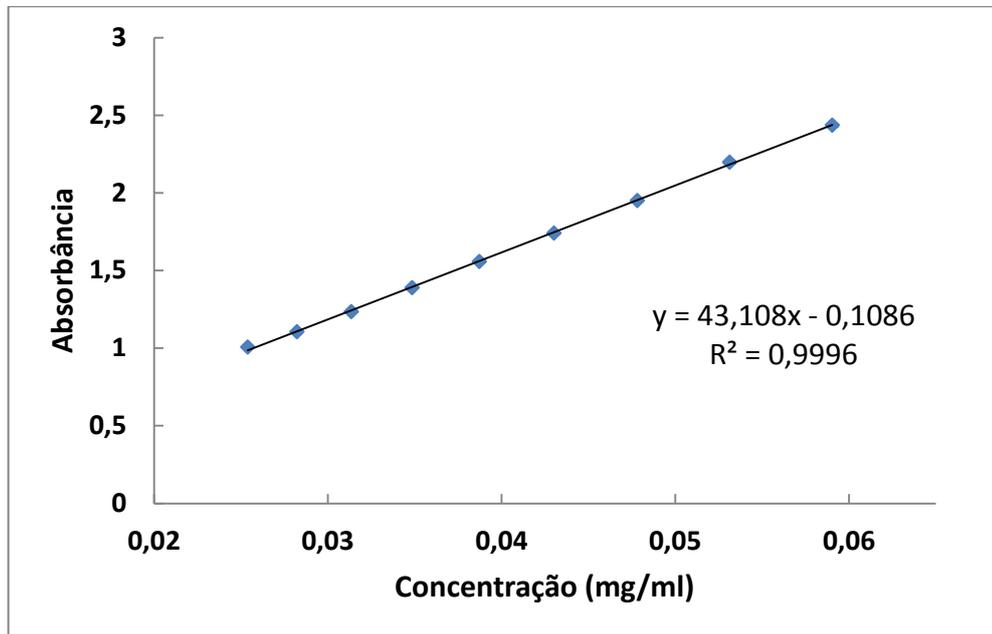
YE, L. et al. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 7, p. 453-458, 2012.

WIDEMANN, B. C.; ADAMSON, P. C. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. **The Oncologist**, v. 11, n. 6, p. 694-703, 2006.

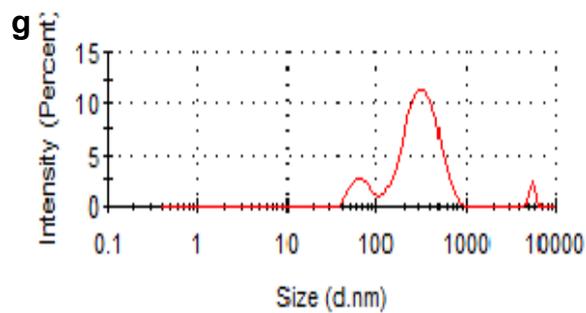
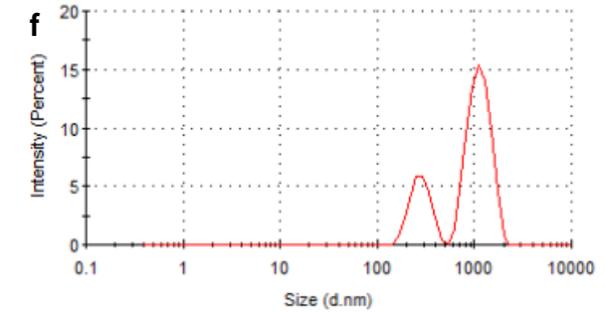
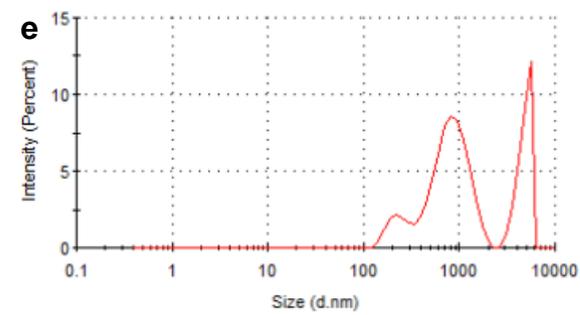
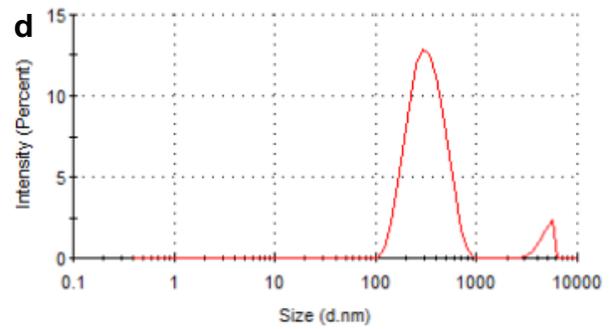
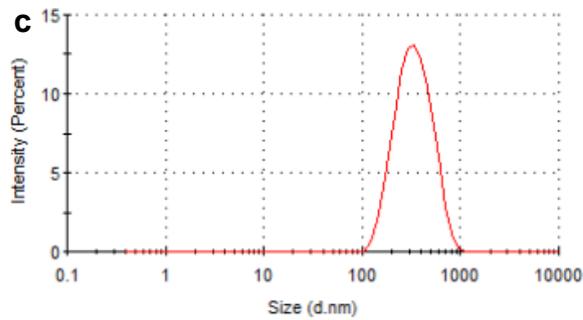
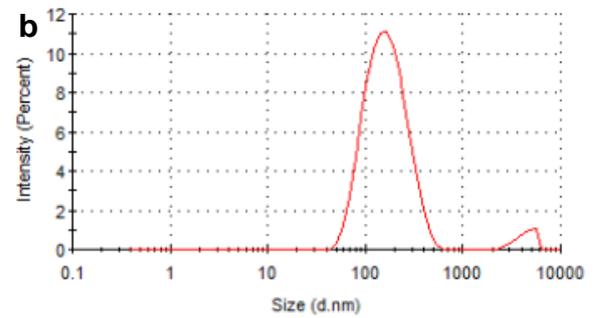
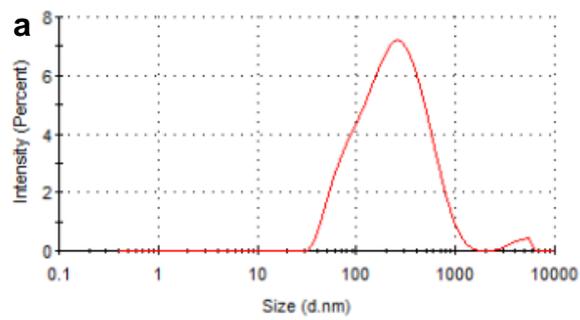
WU, P. et al. A novel methotrexate delivery system based on chitosans-methotrexate covalently conjugated nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 557- 564, 2009.

WU, Y. et al. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 235-245, 2005.

ANEXO A – Curva de calibração do metotrexato

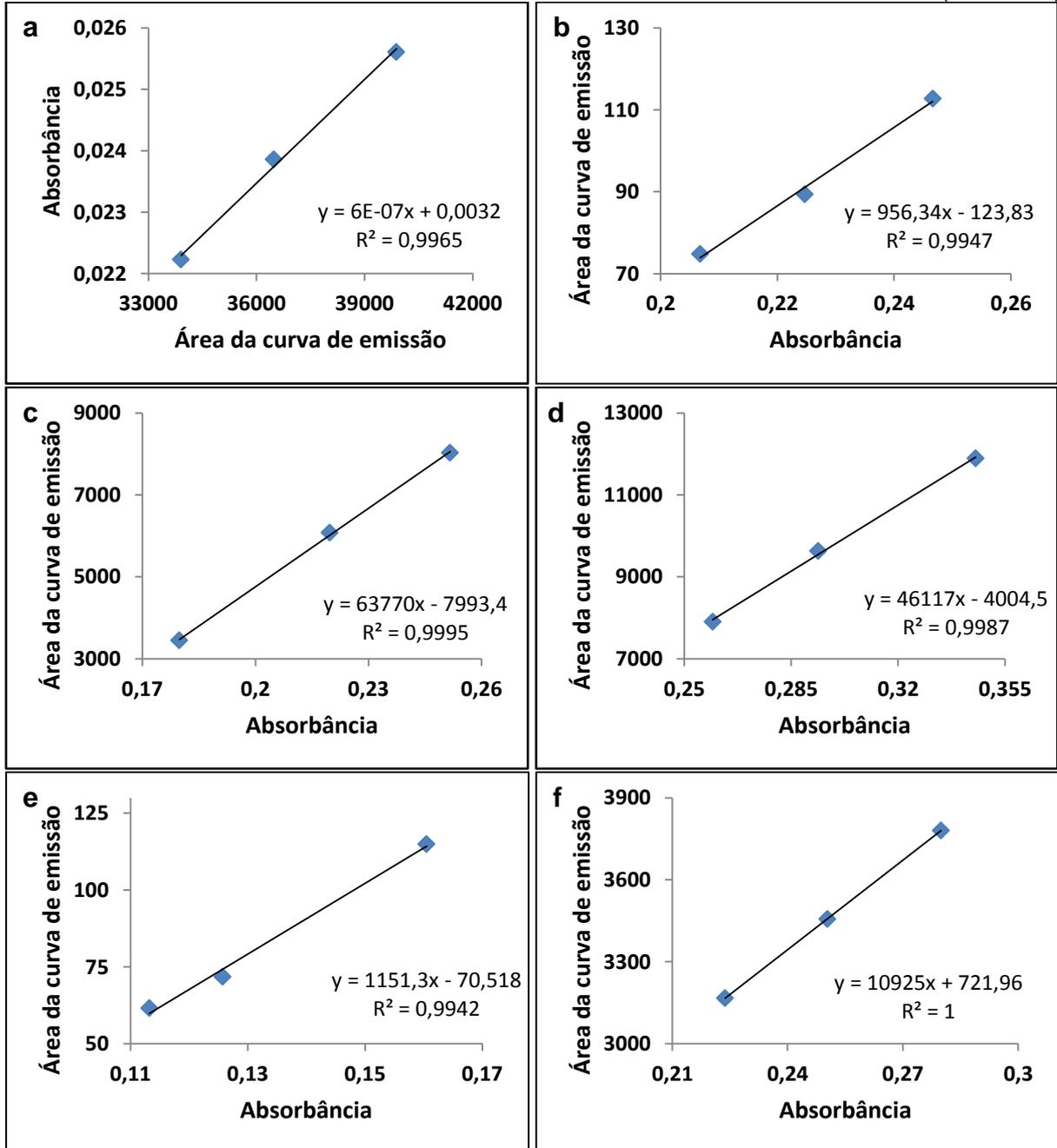


ANEXO B – Análises de DLS. (a) NP Q-HCl 150°C 120', (b) NP Q-HCl 180°C 90', (c) NP Q-AC 150°C 120', (d) NP Q-AC 180°C 90', (e) NP Q-AAc 150°C 120', (f) NP Q-AAc 180°C 90' e (g) NP Q-MTX



ANEXO C – Gráficos utilizados no cálculo da eficiência quântica. (a) 2-AMP, (b) Q-HCl sem TH, (c) NP Q-HCl 150°C 120', (d) NP Q-HCl 180°C 90', (e) Q-AC sem TH, (f) NP Q-AC 150°C 120'

(continua)



ANEXO C – Gráficos utilizados no cálculo da eficiência quântica. (g) NP Q-AC 180°C 90', (h) Q-AAc sem TH, (i) NP Q-AAc 150°C 120' e (j) NP Q-AAc 180°C 90'

(conclusão)

