



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO**

**NANOPARTÍCULAS DE DEXTRANA ENXERTADA COM POLI(N-  
ISOPROPILACRILAMIDA) VIA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE DE *SCHIFF*  
PARA TERAPIA COMBINADA CONTRA O CÂNCER**

**FORTALEZA**

**2023**

MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO

NANOPARTÍCULAS DE DEXTRANA ENXERTADA COM POLI(N-  
ISOPROPILACRILAMIDA) VIA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE DE *SCHIFF*  
PARA TERAPIA COMBINADA CONTRA O CÂNCER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C289n Carneiro, Maria José Magalhães.

Nanopartículas de dextrana enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) via reação de formação de base de Schiff para terapia combinada contra o câncer / Maria José Magalhães Carneiro. – 2023.

143 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.

1. dextrana oxidada. 2. nanopartículas estímulo-responsivas. 3. doxorrubicina. 4. curcumina. 5. terapia fotodinâmica. I. Título.

CDD 540

---

MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO

NANOPARTÍCULAS DE DEXTRANA ENXERTADA COM POLI(N-  
ISOPROPILACRILAMIDA) VIA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BASE DE *SCHIFF*  
PARA TERAPIA COMBINADA CONTRA O CÂNCER

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Química da Universidade  
Federal do Ceará, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutora em Química. Área de  
concentração: Química.

Aprovada em: 15/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Jérsia Araújo  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

---

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

A Deus.

Aos meus pais, Antonio e Antonia.

Ao meu esposo Rafael.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte da vida e meu porto seguro, pelo amor incondicional, pela força e tranquilidade nos momentos de dificuldades e pelas inúmeras oportunidades concedidas a mim.

Aos meus pais, Antonia Rocha Magalhães e Antonio Alves Carneiro, pelo amor, carinho, cuidado, conselhos, incentivo e esforço para eu alcançar meus objetivos.

Ao meu amado esposo e amigo, Rafael do Nascimento Rodrigues, pelo amor, cuidado, compreensão, conselhos e incentivos para seguir em frente. Muito obrigada, por sempre estar ao meu lado nos dias felizes e tristes. Por ter acordado muitas madrugadas, finais de semana e feriados para ir ao laboratório comigo, por ter me consolado e dado força em situações de preocupação. Seu valioso apoio foi extremamente importante em todos os momentos deste trabalho.

Às minhas amigas desde a graduação, Vanessa Abreu, Iolanda Frota, Rayane Rodrigues, Géssica Marques, Carolina Ribeiro e Raquel Freitas pela força e amizade.

À professora Dra. Regina Célia Monteiro de Paula que foi minha orientadora desde a iniciação científica e sempre esteve disponível para ajudar, dando suporte e conselhos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Às demais professoras do Laboratório de Polímeros (LabPol), Dra Judith Pessoa de Andrade Feitosa, Dra Jeanny da Silva Maciel e Dra Pablyana Leila Rodrigues da Cunha pela disponibilidade e contribuição.

A toda equipe do LabPol ao qual faço parte desde 2013, foi minha segunda casa desde a graduação e me proporcionou muitas oportunidades, aperfeiçoamento de conhecimentos e bem como momentos de descontração que trouxeram mais leveza à vida acadêmica.

Ao Irisvan Riberio pela disposição, apoio, grande ajuda nos experimentos e troca de ideias para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Brener Arruda e Wesley Farias pela disposição e ajuda nos experimentos.

À Laís Ramos pela disposição, ajuda para o desenvolvimento do trabalho e troca de conhecimentos.

À Raelle Gomes pelo apoio, ajuda e troca de conhecimentos.

Aos professores Dra. Ana Jérsia Araújo e Dr. José Delano Marinho Filho e às Ms. Gisele Santos de Araújo e Ms. Jéssica Maria Teles Souza pelas contribuições, sugestões e pelos ensaios de citotoxicidade que enriqueceram a tese.

Ao professor Jeanlex Soares de Sousa, à professora Durcilene Alves da Silva e ao Ms. Fábio de Oliveira Silva Ribeiro pela contribuição com as imagens de Microscopia de força atômica.

À Nádia Aline Pitombeira pelas análises de Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará e à técnica Rosemeyre Freire pelas imagens obtidas por Microscopia confocal de varredura a laser.

Ao CENAUREMN e aos operadores Everton Ramos, Laís Ramos e Venícios Sombra pelas análises de Ressonância magnética nuclear.

Ao programa de Pós-graduação em Química pela organização e empenho, pelas disciplinas ofertadas, pelos eventos científicos realizados e pela empatia no momento tão sofrido que passamos na Pandemia.

A todo o corpo docente da Química pela dedicação e empenho para transmitir o conhecimento aos alunos.

Ao corpo técnico que também desempenha papel importante para o pleno funcionamento das atividades de ensino e pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pela infraestrutura e pela concessão de afastamento parcial das minhas atividades laborais para o prosseguimento do Doutorado.

Aos órgãos CAPES, CNPq, FUNCAP, INOMAT e INCT - Polissacarídeo pelo apoio à pesquisa e incentivo financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

## RESUMO

A quimioterapia é uma das principais modalidades terapêuticas contra o câncer, sendo a doxorrubicina (DOX) um dos fármacos mais eficientes no tratamento de vários tipos de neoplasias. Contudo, devido à complexidade e resistência da doença, a eficácia da monoterapia geralmente é limitada. Estudos têm mostrado que a combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica (TFD) pode melhorar a eficácia dos tratamentos, tornando-a uma estratégia promissora para terapia contra o câncer. A curcumina (CUR), composto extraído dos rizomas da *Curcuma longa*, possui propriedades fotossensibilizantes, possibilitando seu uso na TFD. Nanopartículas responsivas a estímulos ganham destaque na entrega de agentes terapêuticos, pois podem promover uma liberação seletiva em ambientes tumorais e, então, minimizar os efeitos colaterais. Neste trabalho, copolímeros de dextrana enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) foram sintetizados via reação de formação de base de *Schiff*, obtendo-se nanopartículas co-incorporadas com DOX e CUR para uso na TFD combinada à quimioterapia. As análises de espalhamento de luz dinâmico mostraram que os copolímeros são termo- e pH-responsivos. A DOX foi conjugada aos copolímeros via reação de formação de base de *Schiff* obtendo-se nanopartículas menores que 130 nm, e a CUR foi co-incorporada por interação não covalente, obtendo-se nanopartículas menores que 90 nm. Os perfis de liberação das nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR mostraram-se dependentes do pH do meio, com maior percentual de DOX e CUR liberados em pH 5,0. As nanopartículas promoveram uma proteção da CUR dos processos de degradação. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que as nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR inibem a proliferação de células de câncer colorretal humano (HCT-116) e promovem citotoxicidade reduzida em células não tumorais de fibroblasto murino (L929). Com a TFD, as nanopartículas carregadas com DOX/CUR causaram maior citotoxicidade em comparação com as nanopartículas incorporadas apenas com DOX. Portanto, as nanopartículas carregadas com DOX/CUR são promissoras para co-liberação seletiva de fármacos em células cancerosas e têm potencial uso na terapia combinada contra o câncer.

**Palavras-chave:** dextrana oxidada; nanopartículas estímulo-responsivas; doxorrubicina; curcumina; terapia fotodinâmica.

## ABSTRACT

Chemotherapy is one of the main therapeutic modalities against cancer, with doxorubicin (DOX) being one of the most effective drugs in the treatment of various types of neoplasms. However, due to the complexity and resistance of the disease, the effectiveness of monotherapy is generally limited. Studies have shown that the combination of chemotherapy and photodynamic therapy (PDT) can improve the effectiveness of treatments, making it a promising strategy for cancer therapy. Curcumin (CUR), a compound extracted from the rhizomes of *Curcuma longa*, possesses photosensitizing properties, enabling its use in PDT. Stimuli-responsive nanoparticles are gaining prominence in the delivery of therapeutic agents, mainly because they can promote selective release in tumor environments and thus minimize side effects. In this study, copolymers of dextran grafted with poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) were synthesized via Schiff base formation reaction, obtaining nanoparticles co-incorporated with DOX and CUR for use in PDT combined with chemotherapy. Dynamic light scattering analysis showed that the copolymers are thermo- and pH-responsive. DOX was conjugated to the copolymers via Schiff base formation, resulting in nanoparticles smaller than 130 nm, and CUR was co-incorporated through non-covalent interaction, yielding nanoparticles smaller than 90 nm. The release profiles of nanoparticles loaded with DOX and DOX/CUR were pH-dependent, with a higher percentage of DOX and CUR released at pH 5.0. The nanoparticles provided protection for CUR against degradation processes. *In vitro* cytotoxicity assays demonstrated that nanoparticles loaded with DOX and DOX/CUR inhibit the proliferation of human colorectal cancer cells (HCT-116) and lead to reduced cytotoxicity in non-tumor murine fibroblast cells (L929). With PDT, nanoparticles loaded with DOX/CUR caused higher cytotoxicity compared to nanoparticles incorporated only with DOX. Therefore, nanoparticles loaded with DOX/CUR are promising for selective co-delivery of drugs into cancer cells and have potential applications in combination therapy against cancer.

**Keywords:** oxidized dextran; stimuli-responsive nanoparticles; doxorubicin; curcumin; photodynamic therapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Ilustração esquemática dos múltiplos fatores que contribuem para a transformação de células normais em células cancerosas as quais podem se espalhar para outros órgãos .....	27
Figura 2	- Estrutura do quimioterápico doxorrubicina e os efeitos colaterais associados ao uso desse fármaco .....	29
Figura 3	- Componentes essenciais para a efetividade da TFD e representação da sua aplicação clínica .....	32
Figura 4	- Diagrama de Jablonski simplificado para o processo da terapia fotodinâmica .....	33
Figura 5	- Rizomas e cúrcuma em pó .....	35
Figura 6	- Estrutura química (A) da curcumina, (B) da demetoxicurcumina e (C) da bisdemetoxicurcumina, além (D) dos produtos de degradação hidrolítica e oxidativa da curcumina .....	36
Figura 7	- Ilustração esquemática (A) do efeito EPR, (B) direcionamento ativo de nanopartículas e (C) liberação de fármaco desencadeada por estímulos endógenos .....	40
Figura 8	- Representação da estrutura da dextrana .....	42
Figura 9	- Esquema da oxidação da dextrana com periodato de sódio. (A) Oxidação com formação de aldeídos nas posições C3 e C4, (B) formação de aldeídos em C2 e C3 e (C) dupla oxidação com liberação de ácido fórmico .....	43
Figura 10	- Reação global de formação de iminas (base de <i>Schiff</i> ) a partir de um aldeído e uma amina primária .....	44
Figura 11	- Estrutura generalizada de alguns tipos de copolímeros .....	45
Figura 12	- Ilustração esquemática das principais estratégias de síntese de copolímeros por enxertia .....	46
Figura 13	- Fórmula estrutural (A) do monômero vinílico NIPAM, (B) do seu	

	polímero PNIPAM e (C) ilustração da propriedade termoresponsiva do PNIPAM .....	48
Figura 14	- Fluxograma metodológico do trabalho .....	52
Figura 15	- Ilustração esquemática das sínteses de (I) DEX-CHO, (II) PNIPAM-NH <sub>2</sub> , (III) copolímero DEX-g-PNIPAM e das (IV) nanopartículas copolímero-DOX e copolímero-DOX/CUR ...	58
Figura 16	- Esquema do procedimento de determinação da viabilidade celular na ausência e exposição à luz azul .....	65
Figura 17	- Estrutura dialdeídica resultante da clivagem da ligação C3-C4 e possíveis estruturas hemiacetálicas formadas .....	68
Figura 18	- (A) Espectros de FTIR das dextranas e seus derivados oxidados e (B) zoom da região de 1770 a 1600 cm <sup>-1</sup> .....	69
Figura 19	- Espectros de RMN <sup>1</sup> H das dextranas (A) DEX <sub>45k</sub> , (C) DEX <sub>310k</sub> e seus derivados oxidados (B) DEX <sub>45k</sub> -CHO, (D) DEX <sub>310k</sub> -CHO em D <sub>2</sub> O a 70 °C .....	70
Figura 20	- Cromatogramas das dextranas e seus derivados oxidados .....	71
Figura 21	- Esquema reacional da síntese do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino .....	72
Figura 22	- Espectros de FTIR dos PNIPAM <sub>17k</sub> , PNIPAM <sub>30k</sub> e do monômero NIPAM .....	73
Figura 23	- Espectros de RMN <sup>1</sup> H (A) PNIPAM <sub>17k</sub> e (B) PNIPAM <sub>30k</sub> em D <sub>2</sub> O a 25 °C .....	74
Figura 24	- Espectros de RMN <sup>13</sup> C (A) PNIPAM <sub>17k</sub> e (B) PNIPAM <sub>30k</sub> em D <sub>2</sub> O a 25 °C .....	75
Figura 25	- Cromatogramas dos PNIPAM-NH <sub>2</sub> sintetizados .....	76
Figura 26	- (A) Taxa de contagem e (B) diâmetro médio em função da temperatura para o PNIPAM <sub>30k</sub> em PBS 7,4 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....	77
Figura 27	- (A) Taxa de contagem e (B) diâmetro médio em função da temperatura para o PNIPAM <sub>17k</sub> em PBS 7,4 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....	77
Figura 28	- Esquema reacional da síntese dos copolímeros via reação de formação de base de <i>Schiff</i> .....	78
Figura 29	- (A) Espectros de FTIR dos copolímeros D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> , D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub> e D <sub>17k</sub> P <sub>30k</sub> e (B) zoom da região de 1770 a 1480 cm <sup>-1</sup> .....	80

Figura 30	- Espectros de RMN $^1\text{H}$ dos copolímeros (A) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ , (B) $\text{D}_{310\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ e (C) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{17\text{k}}$ em $\text{D}_2\text{O}$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$ .....	81
Figura 31	- Razão das intensidades ( $I_{338}/I_{334}$ ) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos copolímeros $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ , $\text{D}_{310\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ e $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{17\text{k}}$ em PBS 7,4 a $25$ e $37\text{ }^\circ\text{C}$ .....	83
Figura 32	- Variação da taxa de contagem e diâmetro médio em função da temperatura para os copolímeros $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ , $\text{D}_{310\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ e $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{17\text{k}}$ em PBS 7,4 .....	85
Figura 33	- (A) Variação do diâmetro médio em função do tempo para os copolímeros em PBS 7,4 e 5,0 a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e (B) distribuições de tamanho para o copolímero $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{17\text{k}}$ em PBS 5,0 a $37\text{ }^\circ\text{C}$ em função do tempo .....	88
Figura 34	- Esquema geral dos copolímeros sintetizados e suas principais características .....	89
Figura 35	- Ilustração esquemática da preparação de nanopartículas de copolímero-DOX por auto-organização e clivagem da base de <i>Schiff</i> em meio ácido, causando a liberação da DOX .....	90
Figura 36	- (A) Espectros de FTIR do copolímero $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ e das nanopartículas $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$ e $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$ e (B) zoom da região de $1770$ a $1480\text{ cm}^{-1}$ .....	91
Figura 37	- Espectros de RMN $^1\text{H}$ do (A) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ , (B) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$ e (C) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$ em $\text{DMSO-d}_6$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$ .....	92
Figura 38	- Imagens de microscopia de força atômica de altura (A, C e E) e de amplitude (B, D e F) das nanopartículas $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ , $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX}$ e $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$ , respectivamente .....	95
Figura 39	- Perfil de liberação <i>in vitro</i> da DOX das nanopartículas (A) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$ e (B) $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$ em PBS 7,4 e 5,0 contendo LSS 0,1% a $37\text{ }^\circ\text{C}$ .....	96
Figura 40	- Correlação dos parâmetros cinéticos do modelo de Zeng com um perfil de liberação de um medicamento modelo .....	98
Figura 41	- Captação celular da DOX livre e das nanopartículas $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$ e $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$ após incubação com células HCT-116 por 24 h observadas por microscopia confocal de varredura a	

	laser. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) e a fluorescência vermelha representa a DOX .....	101
Figura 42	- Esquema geral das nanopartículas copolímero-DOX preparadas e suas principais características .....	102
Figura 43	- Ilustração esquemática da formação das nanopartículas copolímero-DOX/CUR para uso na terapia fotodinâmica combinada a quimioterapia .....	104
Figura 44	- Espectros de FTIR das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2, D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR1 e D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 .....	105
Figura 45	- Espectros de RMN <sup>1</sup> H do (A) D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> , (B) D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2 e (C) D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 em DMSO-d <sub>6</sub> .....	105
Figura 46	- Esquema geral das nanopartículas copolímero-DOX/CUR preparadas e suas principais características .....	108
Figura 47	- Imagens de microscopia de força atômica (A) de altura e (B) de amplitude da nanopartícula D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 .....	108
Figura 48	- Estabilidade química da curcumina livre e incorporada nas nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 em PBS 7,4 e 5,0 a 37 °C..	109
Figura 49	- Perfil de liberação in vitro da DOX e da CUR das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 em PBS 7,4 e 5,0 contendo LSS 0,1% a 37 °C .....	110
Figura 50	- Captação celular da DOX/CUR livre e das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 após incubação com células HCT-116 por 24 h observadas por microscopia confocal de varredura a laser. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul), a fluorescência vermelha representa a DOX e a verde representa a CUR. Fluorescência amarela representa a mistura das cores vermelha (DOX) e verde (CUR) .....	115
Figura 51	- Comparação dos resultados das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2 e D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 que foram testadas na combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica .....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Copolímeros por enxertia à base de dextrana e PNIPAM sintetizados por diferentes rotas de síntese .....	50
Tabela 2	– Faixa de concentração utilizada no teste de citotoxicidade para cada amostra .....	64
Tabela 3	– Grau de oxidação dos derivados DEX <sub>45k</sub> -CHO e DEX <sub>310k</sub> -CHO .....	67
Tabela 4	– Dados de massas molares das dextransas e seus derivados oxidados determinadas por SEC .....	71
Tabela 5	– Valores das razões molares AET/NIPAM, M <sub>pk</sub> , M <sub>w</sub> , M <sub>n</sub> e Đ para os PNIPAM-NH <sub>2</sub> sintetizados .....	76
Tabela 6	– Valores dos rendimentos reacionais dos copolímeros sintetizados .....	79
Tabela 7	– Razão entre as áreas das bandas 1545 e 1154 cm <sup>-1</sup> (A <sub>1545</sub> /A <sub>1154</sub> ) para os copolímeros sintetizados .....	80
Tabela 8	– Valores de substituição molar (SM) para os copolímeros sintetizados .....	82
Tabela 9	– Valores de CAC para os copolímeros D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> , D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub> e D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub> em PBS 7,4 a 25 e 37 °C .....	84
Tabela 10	– Eficiência de carregamento e carga de fármaco das nanopartículas carregadas com doxorrubicina .....	92
Tabela 11	– Valores de diâmetro médio e IPD para as nanopartículas sem DOX e carregadas com DOX .....	93
Tabela 12	– Parâmetros cinéticos da liberação de DOX das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX1 e D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2 .....	98
Tabela 13	– Valores de CI <sub>50</sub> das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX e D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2 e DOX livre pelo ensaio MTT após 72 h de incubação ..	99
Tabela 14	– Eficiência de carregamento e carga de fármaco das nanopartículas carregadas com doxorrubicina e curcumina .....	106
Tabela 15	– Valores de diâmetro médio e IPD para as nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR .....	107
Tabela 16	– Parâmetros cinéticos da liberação de DOX e CUR da	

	nanopartícula D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 .....	111
Tabela 17	– Valores de CI <sub>50</sub> da DOX livre, CUR livre e mistura DOX/CUR livre em células L929 e HCT-116 sem e com TFD, pelo ensaio MTT após 72 h de incubação .....	113
Tabela 18	– Valores de CI <sub>50</sub> das nanopartículas D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2 e D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2 em células L929 e HCT-116 sem e com TFD, pelo ensaio MTT após 72 h de incubação .....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AET·HCl	Cloridrato de 2-aminoetanotiol
ALA	Ácido aminolevulínico
ATRP	Polimerização radicalar controlada por transferência de átomo
BMC	Bisdemetoxicurcumina
CAC	Concentração de associação crítica
CAN	Nitrato de amônio cérico IV
cél	Célula
CF	Carga de fármaco
Cl <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CUR	Curcumina
D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub>	Copolímero de dextrana oxidada (DEX <sub>310k</sub> -CHO) enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) de massa molar $3,0 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub>	Copolímero de dextrana oxidada (DEX <sub>45k</sub> -CHO) enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) de massa molar $1,7 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub>	Copolímero de dextrana oxidada (DEX <sub>45k</sub> -CHO) enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) de massa molar $3,0 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX	Nanopartícula do copolímero D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> conjugado com doxorrubicina, 10% (m/m)
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2	Nanopartícula do copolímero D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> conjugado com doxorrubicina, 20% (m/m)
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR	Nanopartícula do copolímero D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> co-incorporado com doxorrubicina, 20% (m/m) e curcumina, 10% (m/m)
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2	Nanopartícula do copolímero D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> co-incorporado com doxorrubicina, 20% (m/m), e curcumina, 20% (m/m)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol

DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DEX	Dextrana
DEX <sub>310k</sub>	Dextrana com massa molar ponderal média de $3,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$
DEX <sub>310k</sub> -CHO	Dextrana oxidada obtida a partir da DEX <sub>310k</sub>
DEX <sub>45k</sub>	Dextrana com massa molar ponderal média de $4,5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
DEX <sub>45k</sub> -CHO	Dextrana oxidada obtida a partir da DEX <sub>45k</sub>
DEX-CHO	Dextrana oxidada
DEX-g-PNIPAM	Copolímero de dextrana enxertada com poli(N-isopropilacrilamida)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMC	Demetoxicurcumina
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DSS	2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato-d <sub>6</sub> de sódio
EC	Eficiência de carregamento
EDC	Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
GO	Grau de oxidação
HPV	Papilomavírus Humano
IC	Intervalo de confiança
I.F.	Intensidade de fluorescência
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IPD	Índice de polidispersividade
KPS	Persulfato de potássio
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>

LSS	Lauril sulfato de sódio
MFA	Microscopia de força atômica
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
m-thpc	Meta-tetra (hidroxifenil) clorina
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NIPAM	N-isopropilacrilamida
NP6e	Mono-L-aspartil clorina e6
BIOTEC	Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida)
PNIPAM <sub>17k</sub>	Poli(N-isopropilacrilamida) amino terminado com massa molar ponderal média de $1,7 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
PNIPAM <sub>30k</sub>	Poli(N-isopropilacrilamida) amino terminado com massa molar ponderal média de $3,0 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$
PNIPAM-NH <sub>2</sub>	Poli(N-isopropilacrilamida) amino terminado
RE%	Rendimento da reação de enxertia
RMN	Ressonância magnética nuclear
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho
SM	Substituição molar
TEA	Trietilamina
TFD	Terapia fotodinâmica
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFDPAr	Universidade Federal do Delta do Parnaíba
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV-vis	Ultravioleta-visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa; tipo de ligação glicosídica
$\beta$	Beta; tipo de ligação glicosídica
$\delta$	Delta; Deslocamento químico em Ressonância magnética nuclear e vibração de deformação angular ou dobramento em Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho
$\Delta G$	Energia livre de Gibbs
$D$	Dispersão
$k_B$	Constante de Boltzmann
$k_{off}$	Constante de dissociação
$k_{on}$	Constante de associação
$k_s$	Constante de difusão
$\lambda$	Comprimento de onda
$M_0$	Quantidade inicial de fármaco
$m_{CP}$	Massa de copolímero purificado
$m_{DEX-CHO}$	Massa de dextrana oxidada
$m_{PNIPAM}$	Massa de poli(N-isopropilacrilamida) amino terminado
$M_n$	Massa molar numérica média
$M_{pk}$	Massa molar de pico
$M_t$	Quantidade de fármaco liberada no tempo t
$M_w$	Massa molares ponderal média
$m/m$	Razão massa/massa
$m/v$	Razão massa/volume
$\nu$	Vibração de deformação axial ou estiramento em Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho
$T$	Temperatura
$t$	Tempo
$V$	Volume
$V_e$	Volume de eluição

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	27
2.1	Câncer .....	27
2.1.1	<i>Doxorrubicina</i> .....	29
2.1.2	<i>Terapia combinada</i> .....	30
2.1.3	<i>Terapia fotodinâmica</i> .....	31
2.1.4	<i>Curcumina</i> .....	34
2.2	Nanopartículas .....	38
2.3	Dextrana e dextrana oxidada .....	41
2.4	Base de <i>Schiff</i> .....	43
2.5	Copolímeros por enxertia .....	45
2.6	Poli(N-isopropilacrilamida) .....	47
3	OBJETIVOS .....	51
3.1	Objetivo geral .....	51
3.2	Objetivos específicos .....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	52
4.1	Fluxograma metodológico .....	52
4.2	Materiais .....	53
4.3	Oxidação da dextrana .....	53
4.3.1	<i>Determinação do grau de oxidação (GO)</i> .....	53
4.4	Síntese do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino (PNIPAM-NH <sub>2</sub> ) .....	54
4.4.1	<i>Determinação da quantidade de grupos amino (NH<sub>2</sub>)</i> .....	55
4.5	Síntese dos copolímeros dextrana-g-poli(N-isopropilacrilamida) via reação de formação de base de <i>Schiff</i> .....	55
4.5.1	<i>Rendimento da reação de enxertia (RE%)</i> .....	55
4.6	Preparação das nanopartículas copolímero-DOX .....	56
4.7	Preparação das nanopartículas copolímero-DOX/CUR .....	57
4.8	Caracterizações .....	59
4.8.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por</i>	

	<i>transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	59
4.8.2	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i> .....	59
4.8.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i> .....	59
4.8.4	<i>Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)</i> .....	59
4.8.5	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i> .....	60
4.8.6	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	61
4.8.7	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i> .....	61
4.9	Estudo de liberação in vitro da doxorrubicina e da curcumina .....	62
4.10	Ensaio de citotoxicidade .....	63
4.11	Ensaio de captação celular .....	65
4.12	Análise estatística .....	66
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
5.1	Oxidação da dextrana .....	67
5.2	Caracterização das dextranas e seus derivados oxidados .....	68
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	68
5.2.2	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)</i> .....	69
5.2.3	<i>Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)</i> .....	70
5.3	Síntese do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino .....	72
5.4	Caracterização do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino .....	73
5.4.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	73
5.4.2	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i> .....	74
5.4.3	<i>Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)</i> .....	75
5.4.4	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	76
5.5	Síntese dos copolímeros dextrana-g-poli(N-isopropilacrilamida) ...	78
5.6	Caracterização dos copolímeros .....	79
5.6.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	79
5.6.2	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)</i> .....	81
5.6.3	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i> .....	82
5.6.4	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	84

5.6.5	<i>Sensibilidade ao pH do meio</i> .....	87
5.7	Resumo geral dos copolímeros .....	89
5.8	Preparação das nanopartículas copolímero-DOX .....	90
5.9	Caracterização das nanopartículas carregadas com doxorrubicina .....	91
5.9.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)</i> .....	91
5.9.2	<i>Eficiência de carregamento de fármaco (ECF) e a carga de fármaco (CF)</i> .....	92
5.9.3	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	93
5.9.4	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i> .....	95
5.9.5	<i>Estudo de liberação in vitro da doxorrubicina</i> .....	96
5.9.6	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	99
5.9.7	<i>Ensaio de captação celular</i> .....	100
5.10	Resumo geral das nanopartículas copolímero-DOX .....	102
5.11	Preparação das nanopartículas copolímero-DOX/CUR .....	103
5.12	Caracterização das nanopartículas carregadas com doxorrubicina e curcumina .....	104
5.12.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)</i> .....	104
5.12.2	<i>Eficiência de carregamento de fármaco (ECF) e a carga de fármaco (CF)</i> .....	106
5.12.3	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	107
5.12.4	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i> .....	108
5.12.5	<i>Estabilidade química da curcumina nas nanopartículas</i> .....	109
5.12.6	<i>Estudo de liberação in vitro da doxorrubicina e curcumina</i> .....	110
5.12.7	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	112
5.12.8	<i>Ensaio de captação celular</i> .....	115
5.13	Resumo geral das nanopartículas copolímero-DOX e copolímero DOX/CUR .....	116
6	CONCLUSÃO .....	118

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE A- CROMATOGRAMA DA CURCUMINA COMERCIAL E TABELA COM OS PERCENTUAIS DOS CURCUMINÓIDES .....</b>	<b>134</b>
<b>APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DOXORRUBICINA E DA CURCUMINA EM DMSO .....</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DOXORRUBICINA EM PBS 7,4 + LSS 0,1% E PBS 5,0 + LSS 0,1% .....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICE D - CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CURCUMINA EM PBS 7,4 + LSS 0,1% E PBS 5,0 + LSS 0,1% .....</b>	<b>137</b>
<b>APÊNDICE E – CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA DEX<sub>45k</sub>, DEX<sub>45k</sub>-CHO, DEX<sub>310k</sub> E DEX<sub>310k</sub>-CHO .....</b>	<b>138</b>
<b>APÊNDICE F – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS L929 E HCT-116 TRATADAS COM DOXORRUBICINA LIVRE E COM AS NANOPARTÍCULAS D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX E D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 .....</b>	<b>139</b>
<b>APÊNDICE G – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS L929 E HCT-116 TRATADAS COM DOXORRUBICINA LIVRE, CURCUMINA LIVRE E MISTURA DOX/CUR LIVRE, SEM E COM TFD .....</b>	<b>140</b>
<b>APÊNDICE H – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS L929 E HCT-116 TRATADAS COM AS NANOPARTÍCULAS D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 E D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2, SEM E COM TFD .....</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICE I – TABELA COM VALORES DE CI<sub>50</sub> DAS NANOPARTÍCULAS D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 E D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 EM CÉLULAS L929 E HCT-116, SEM E COM TFD .....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO A – FICHA DE INFORMAÇÕES DA CURCUMINA COMERCIAL .....</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer, conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que podem se espalhar por todo o corpo, causou quase 10 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2022 (Ferlay et al., 2024). As modalidades convencionais de tratamento dessa doença são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo a última uma das abordagens terapêuticas mais utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer (Anand et al., 2023).

A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico da classe das antraciclinas que se destaca por demonstrar eficiência no tratamento de uma ampla gama de tumores (Tacar et al., 2013; Sritharan; Sivalingam, 2021). O complexo mecanismo de ação da DOX baseia-se na sua capacidade de intercalar com o DNA e inibir a enzima topoisomerase II, causando a ruptura do DNA e consequente morte celular. O seu uso prolongado pode provocar principalmente cardiotoxicidade, além de danos ao cérebro, fígado, rins e supressão da medula óssea (Sritharan; Sivalingam, 2021; Kamińska; Cudnoch-Jędrzejewska, 2023).

No entanto, a complexidade e a resistência do câncer limitam a eficácia da monoterapia (tratamento com um único medicamento) (Dai et al., 2017). Além disso, os quimioterápicos não são seletivos e podem atingir células cancerosas e normais, causando inúmeros efeitos colaterais (Senapati et al., 2018; Anand et al., 2023).

Estudos reportam que a combinação de agentes terapêuticos ou de outra modalidade de tratamento pode inibir o crescimento tumoral por múltiplas vias e aumentar a sensibilidade das células cancerosas aos medicamentos, geralmente resultando em um efeito aditivo ou sinérgico (Dai et al., 2017; Pan et al., 2019; Aghajanzadeh et al., 2022). Vários estudos têm demonstrado que a combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica (TFD) pode melhorar a eficácia dos tratamentos, o que a torna uma estratégia promissora para a terapia contra o câncer (Grin et al., 2022; Menilli et al., 2022; Olszowy et al., 2023).

A TFD é um tratamento minimamente invasivo que requer a combinação de luz, um fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular presente no tecido (Ailioaie et al., 2021; Olszowy et al., 2023). O fotossensibilizador é ativado pela luz em um comprimento de onda específico, levando a ocorrência de reações fotoquímicas que

produzem espécies reativas de oxigênio que podem causar a morte celular (Correia et al., 2021; Aghajanzadeh et al., 2022).

A curcumina (CUR), composto extraído dos rizomas da *Curcuma longa*, apresenta diversas atividades farmacológicas, com destaque para a atividade citotóxica contra várias linhagens de células cancerosas (Kotha; Luthria, 2019; Zheng; Mcclements, 2020). Além disso, possui propriedade fotossensibilizante, o que torna possível a sua utilização como fotossensibilizador na TFD (Aziz et al., 2023; Kah et al., 2023). Apesar dos seus vários efeitos terapêuticos, a aplicação clínica da CUR é limitada devido a sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e baixa estabilidade química em condições fisiológicas (Nelson et al., 2017; Zheng; Mcclements, 2020).

Para superar as inúmeras limitações que a curcumina apresenta, e bem como a quimioterapia, as nanopartículas à base de polissacarídeos são promissoras visto que podem promover a proteção do fármaco na corrente sanguínea, prolongar o tempo de circulação sistêmica dos agentes terapêuticos e promover o acúmulo e a liberação controlada em locais específicos, via direcionamento passivo ou ativo (Yang et al., 2018; Nirmala et al., 2023).

A alta taxa de proliferação das células cancerosas provoca um acúmulo de ácido láctico nos tecidos tumorais, o que os tornam mais ácidos quando comparados aos tecidos saudáveis (pH 7,2–7,4). No microambiente extracelular de um tumor, os valores de pH são de 6,5–6,8, enquanto nos endossomos o meio é ainda mais ácido (no endossomo inicial pH 5,5–6,5 e no endossomo tardio pH 5,0–5,5) (Wang et al., 2016). Essa diferença de pH tem sido amplamente explorada para a liberação seletiva de medicamentos antitumorais (Curcio et al., 2020; Rodríguez et al., 2023; Tian et al., 2023). Em geral, ligações ácido-lábeis entre o fármaco e o polímero ou na composição estrutural do polímero são usadas para aumentar a liberação do fármaco nos tecidos tumorais. As ligações mais utilizadas são hidrazona, imina, oxima e acetal (Wang et al., 2018; Wang et al., 2022).

As bases de *Schiff*, resultantes da reação entre compostos carbonilados (aldeídos ou cetonas) e grupos amino, são reversíveis com a variação do valor do pH do meio. Em solução aquosa com pH abaixo de 6,5, a ligação imina formada a partir de aminas primárias e aldeídos é clivada, enquanto acima desse valor a ligação imina é considerada estável (Xin; Yuan, 2012). Devido à facilidade de síntese

e sensibilidade do produto ao pH, a reação de formação de base de *Schiff* é uma boa estratégia para a preparação de materiais estímulo responsivos (Jia; Li, 2015; Xu et al., 2019; Tian et al., 2023).

A copolimerização por enxertia é uma estratégia amplamente utilizada para modificar polissacarídeos e seus derivados com polímeros sintéticos (Atanase et al., 2017; Seidi et al., 2018). Copolímeros por enxertia constituídos por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos têm propriedades anfífilas e em solução aquosa podem se auto-organizar em nanopartículas (Atanase et al., 2017). Um caso específico são os copolímeros “duplamente hidrofílicos” que adquirem características anfífilas quando são aplicados estímulos externos, como pH e/ou temperatura (Atanase et al., 2017; Tu et al., 2018; Lima et al., 2021). Nos últimos anos, vários copolímeros por enxertia à base de polissacarídeos foram relatados para aplicação no tratamento de câncer e inflamações (Atanase et al., 2017; Gomes et al., 2020; Santos et al., 2023).

A dextrana é um homopolissacarídeo de glicose de origem bacteriana, solúvel em água, biocompatível e biodegradável (Chen et al., 2020; Petrovici et al., 2023). Em virtude de suas excelentes características, tem sido amplamente explorada no desenvolvimento de diferentes tipos de sistemas de liberação de fármacos anticâncer, como nanocarreadores (Grebinyk et al., 2022; Dong et al., 2023), microesferas (Rai et al., 2016) e hidrogéis (Huang et al., 2020; Fan et al., 2023).

O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) é um polímero sintético termorresponsivo que possui temperatura de transição de fase (LCST) em torno de 32 °C, característica que tem despertado interesse científico em vários estudos voltados para aplicações biomédicas, uma vez que é uma temperatura próxima a do corpo humano (Schild, 1992; Bordat et al., 2019).

Copolímeros por enxertia à base de dextrana e PNIPAM têm sido sintetizados por polimerização via radicais livres (Yeshchenko et al., 2022), polimerização radicalar controlada por transferência de átomo (ATRP) (Blanco-Fernandez et al., 2017) e química de carbodiimida (Zhang, 2005). A síntese de copolímeros por enxertia via formação de bases de *Schiff* tem sido pouco explorada, principalmente a enxertia de PNIPAM em polissacarídeos. Nosso grupo de pesquisa relatou a preparação de copolímeros de enxerto à base de galactomanana e PNIPAM por esta metodologia (Lima et al., 2021). Os copolímeros sintetizados

apresentaram propriedades promissoras para uso como sistema de liberação de fármacos, principalmente por conjugação com moléculas que possuem grupos amino em suas estruturas. A enxertia de PNIPAM em dextrana por esta via torna-se atrativa pela possibilidade de obtenção de copolímeros de forma simples com propriedades como termossensibilidade e resposta ao pH.

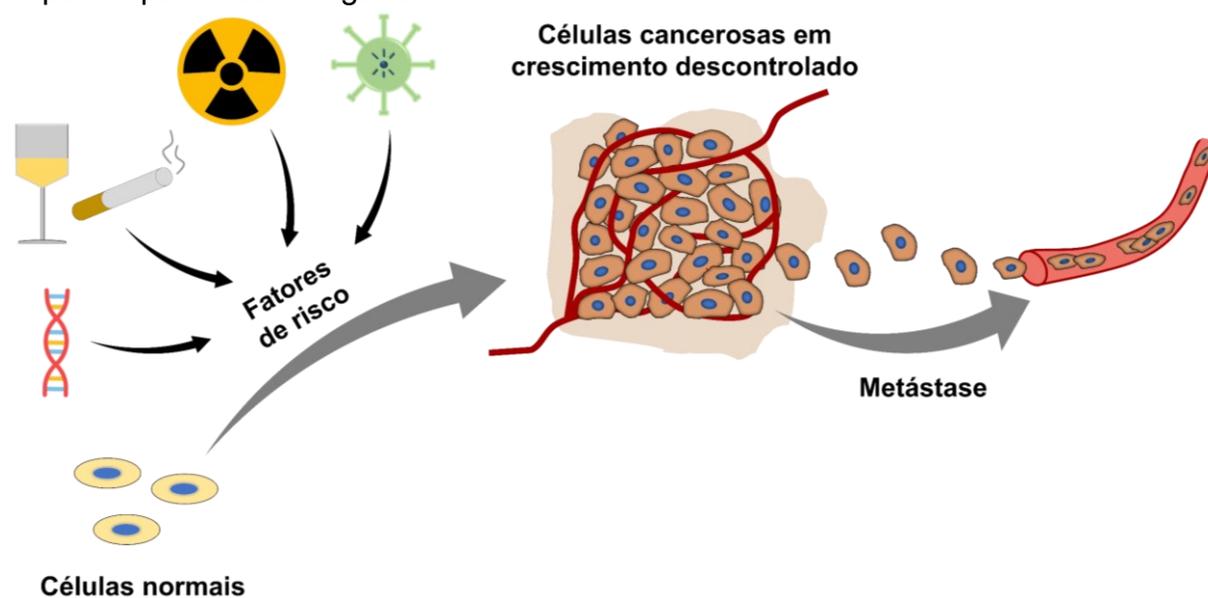
Neste estudo, copolímeros termo- e pH-responsivos de dextrana-*g*-poli(N-isopropilacrilamida) foram sintetizados via reação de formação de base de *Schiff*. A doxorrubicina foi conjugada aos copolímeros por meio do mesmo tipo de reação. Além disso, a curcumina foi incorporada por interação não covalente a fim de aumentar a atividade citotóxica por meio da combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células (neoplasia) que têm potencial de se espalhar por todo o corpo (metástase). Múltiplos fatores, como predisposição genética, estilo de vida (tabagismo, consumo de álcool e maus hábitos alimentares), exposição à radiação (Raios-X, radiação ultravioleta) e infecções (Papilomavírus Humano – HPV, *Helicobacter pylori*), contribuem para o desenvolvimento do câncer (Figura 1) (Lewandowska et al., 2019; Kamal et al., 2022).

Figura 1 – Ilustração esquemática dos múltiplos fatores que contribuem para a transformação de células normais em células cancerosas as quais podem se espalhar para outros órgãos



De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte prematura antes dos 70 anos na maioria dos países. Em 2022, foram diagnosticados 20 milhões de novos casos (18,7 milhões, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) e registrados 9,74 milhões de óbitos em todo mundo (9,67 milhões, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). Mundialmente, projetou-se para o ano de 2045 a ocorrência de 32,6 milhões de novos casos de câncer (30,2 milhões, excluindo os casos de câncer de pele não

melanoma) e 16,9 milhões de óbitos (16,8 milhões, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), ou seja, um aumento de 63% de novos casos e 73% de óbitos em relação ao ano de 2022 (Ferlay et al., 2024).

Para o Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou o surgimento de 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025, 483 mil excluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Estima-se uma maior incidência para o câncer de pele não melanoma (220 mil), seguido pelo câncer de mama (74 mil), próstata (72 mil), colón e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2022).

Esses dados epidemiológicos mostram que o câncer representa um problema de saúde mundial e a comunidade científica tem concentrado esforços continuamente no aperfeiçoamento e desenvolvimento de estratégias de tratamento eficientes (Anand et al., 2023; Olszowy et al., 2023; Sordo-Bahamonde et al., 2023).

As modalidades convencionais de tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia ou a combinação dessas terapias, enquanto dentre as modalidades modernas estão a terapia direcionada (ou terapia-alvo), a imunoterapia, a terapia hormonal e a terapia fotodinâmica (Debela et al., 2021; Gunaydin et al., 2021; Anand et al., 2023). Dessas abordagens terapêuticas, a quimioterapia continua sendo o tratamento mais utilizado para diversos tipos de câncer. A quimioterapia utiliza fármacos que atuam interferindo no ciclo celular, ocasionando a morte das células em crescimento acelerado (Anand et al., 2023). Atualmente, vários agentes quimioterápicos, como paclitaxel, doxorubicina, oxaliplatina e docetaxel, estão disponíveis para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias (Menilli et al., 2022; Anand et al., 2023).

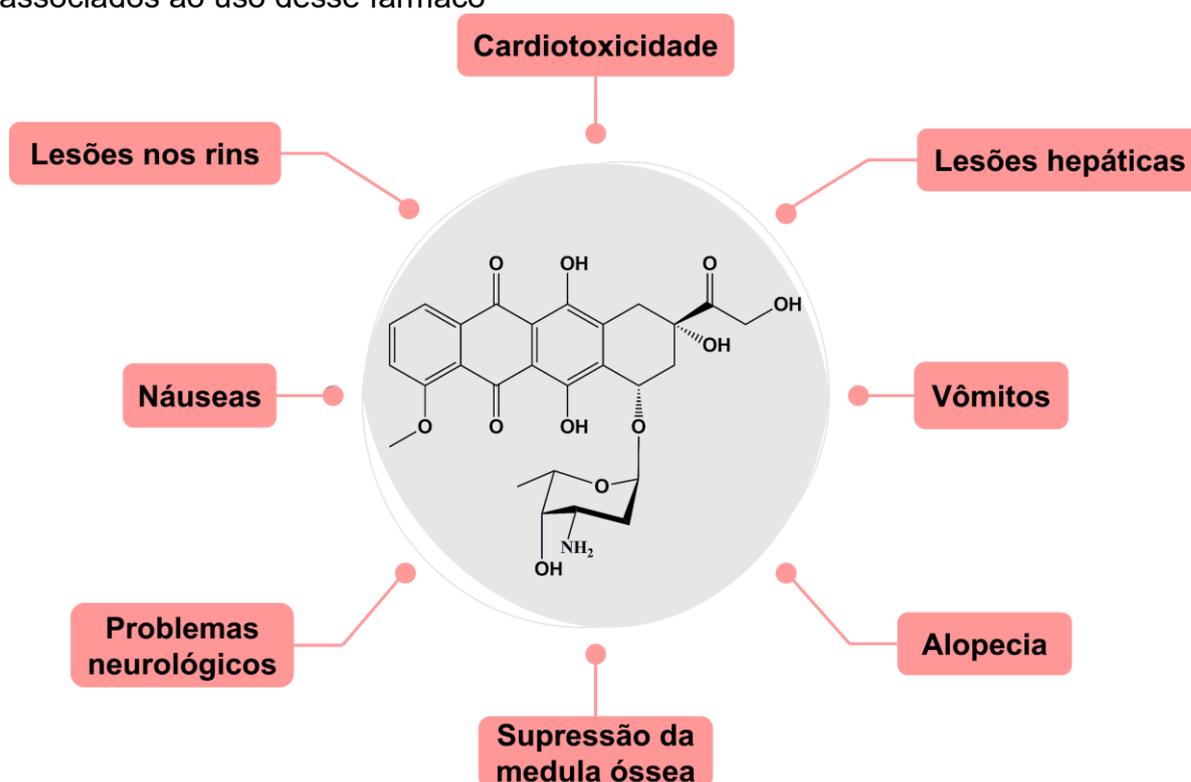
Os agentes quimioterápicos não são seletivos para células cancerosas, podendo causar danos também às células saudáveis, como da pele, do cabelo, células epiteliais intestinais e da medula óssea que apresentam uma rápida proliferação (Feng; Chien, 2003; Anand et al., 2023). Quando as células da medula óssea são afetadas ocorre uma redução dos níveis de hemácias, glóbulos brancos e plaquetas no organismo, aumentando o risco de desenvolvimento de infecções virais e bacterianas (Anand et al., 2023). No geral, os graves efeitos colaterais causados aos tecidos e órgãos saudáveis são responsáveis pelos altos índices de morte de pacientes com câncer (Senapati et al., 2018). Além disso, a baixa biodisponibilidade desses fármacos, por apresentarem baixa solubilidade em meio aquoso, ocasiona a

necessidade de altas dosagens para atingir o nível terapêutico, provocando uma elevada toxicidade às células normais e aumento da resistência a múltiplos medicamentos (Senapati et al., 2018).

### 2.1.1 Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) (Figura 2), pertencente à classe das antraciclina, é considerada um dos fármacos citotóxicos mais eficientes no tratamento de vários tipos de câncer, como mama, ovário, tireóide, pâncreas, estômago e pulmão (Tacar et al., 2013; Sritharan; Sivalingam, 2021).

Figura 2 – Estrutura do quimioterápico doxorrubicina e os efeitos colaterais associados ao uso desse fármaco



Fonte: elaborada pela autora.

A molécula da doxorrubicina é composta por uma estrutura tetracíclica com porções quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, além de substituintes metóxi, hidroxilacetil, álcool e um açúcar (conhecido como daunosamina) unido por uma ligação glicosídica (Tacar et al., 2013). Em 1969, foi isolada a partir da bactéria *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, e sua primeira formulação comercial

(Adriamycin®; DOX·HCl) foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*), em 1974 (Cagel et al., 2017).

O efeito anticâncer da DOX é atribuído a sua capacidade de intercalar com os pares de bases da dupla hélice do DNA e interromper o reparo do DNA mediado pela enzima topoisomerase II, causando a ruptura do DNA e consequentemente a morte celular. Além disso, o mecanismo de ação da DOX envolve geração de radicais livres por meio de reações redox, atribuídas à sua porção quinona, o que causa mais danos ao DNA e potencializa sua eficácia em inibir a proliferação celular (Benjanuwattra et al., 2020; Sritharan; Sivalingam, 2021).

Entretanto, o uso prolongado de DOX pode promover a resistência a múltiplos medicamentos e os seus mecanismos de ação também afetam a estrutura e função das células normais, causando principalmente cardiotoxicidade, que é dose-dependente. A dose cumulativa máxima recomendada de doxorubicina é de 550 mg m<sup>-2</sup> de área de superfície corporal para evitar cardiomiopatia. Outros efeitos colaterais causados pela DOX incluem náuseas, vômitos, alopecia, problemas neurológicos, lesões hepáticas, lesões nos rins e supressão da medula óssea (Figura 2) (Tacar et al., 2013; Sritharan; Sivalingam, 2021; Kamińska; Cudnoch-Jędrzejewska, 2023).

Devido à natureza complexa do câncer e à sua tendência a se tornar resistente a medicamentos, a eficácia da monoterapia (tratamento com um único medicamento) geralmente é limitada. Uma estratégia que tem sido explorada para superar esses problemas é a terapia combinada (Dai et al., 2017; Pan et al., 2019; Aghajanzadeh et al., 2022).

### **2.1.2 Terapia combinada**

A terapia combinada refere-se à combinação de agentes terapêuticos ou de diferentes modalidades de tratamento e foi proposta para o tratamento do câncer, em 1965 (Frei et al., 1965; Rawal; PATEL, 2019). Os fármacos prednisona, metotrexato, vincristina e 6-mercaptopurina foram coadministrados em pacientes pediátricos com leucemia linfocítica aguda e a combinação proporcionou uma redução da carga tumoral e das taxas de recorrência (Frei et al., 1965).

Diversos estudos têm sido realizados e essa abordagem de tratamento tem demonstrado maior eficácia terapêutica comparada à monoterapia. Ela pode

inibir o crescimento tumoral por múltiplas vias e aumentar a sensibilidade das células cancerosas aos medicamentos, geralmente resultando em um efeito aditivo ou sinérgico (Dai et al., 2017; Pan et al., 2019; Aghajanzadeh et al., 2022).

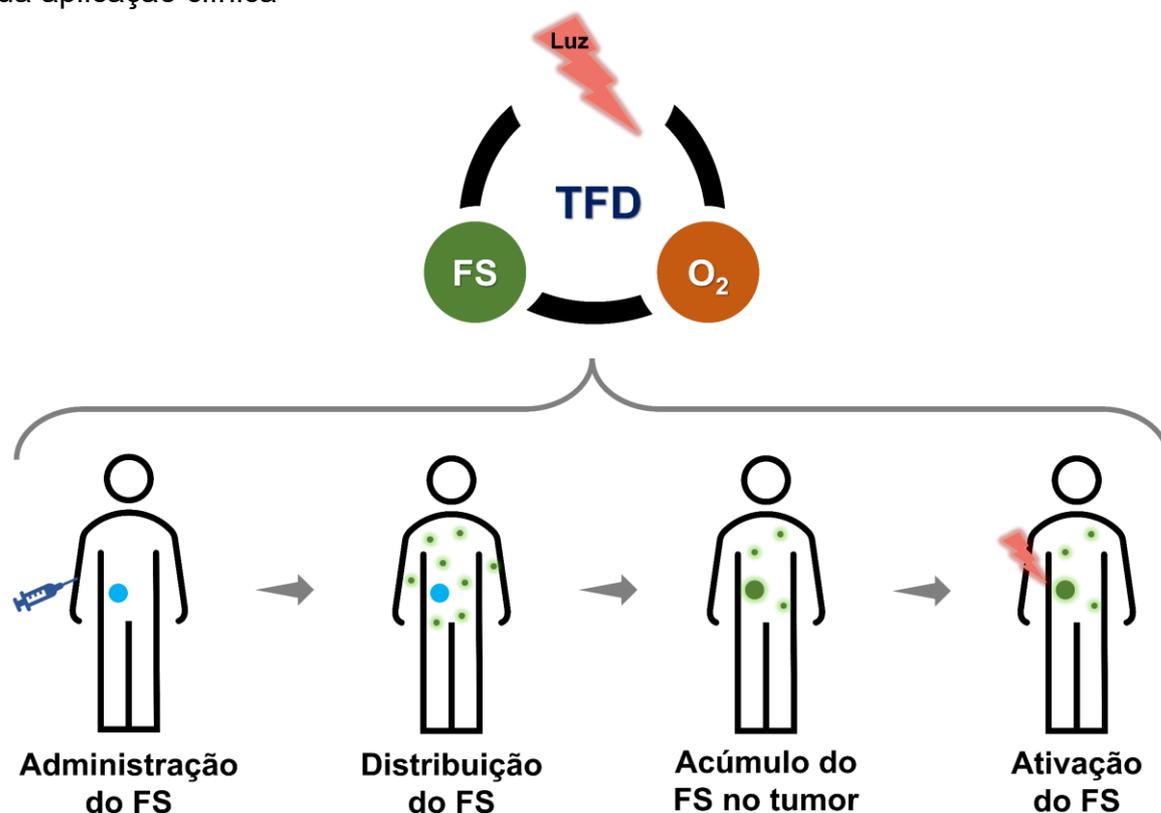
A combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica (TFD) tem melhorado a eficácia terapêutica, em estudos *in vitro* e *in vivo*, o que torna uma estratégia promissora para o tratamento do câncer (Grin et al., 2022; Menilliet al., 2022; Olszowy et al., 2023). Marocco et al. (2022) investigaram os efeitos da combinação do quimioterápico doxorrubicina e do fotossensibilizador (FS) ácido aminolevulínico (ALA) no tratamento de células de tumores ósseos. Foi observado que a combinação aumentou a atividade citotóxica em relação aos tratamentos isolados.

### **2.1.3 Terapia fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica é uma abordagem terapêutica minimamente invasiva que tem sido utilizada no tratamento de várias condições patológicas, incluindo o câncer, como os cânceres de pele, esófago, pulmão e bexiga (Correia et al., 2021; Menilli et al., 2022; Kolarikova et al., 2023). O primeiro estudo clínico em humanos usando a TFD foi relatado, em 1976, por Kelly e Snell que utilizaram um derivado da hematoporfirina em pacientes com câncer de bexiga. A aprovação da TFD para uso no tratamento de alguns tipos de câncer ocorreu na década de 1990 (Kelly; Snell, 1976; Gunaydin et al., 2021).

Esta modalidade de tratamento requer a combinação de três componentes essenciais que são luz em comprimento de onda específico, um fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular presente no tecido (Ailioaie et al., 2021; Olszowy et al., 2023). O tratamento consiste na administração de um FS, geralmente por via intravenosa, que após sua distribuição pelo corpo poderá se acumular no tecido tumoral através de estratégias de direcionamento passivo ou ativo (Subseção 2.2). Então, é realizada a aplicação de luz local que resultará em danos celulares e morte celular (Figura 3) (Correia et al., 2021; Gunaydin et al., 2021).

Figura 3 – Componentes essenciais para a efetividade da TFD e representação da sua aplicação clínica

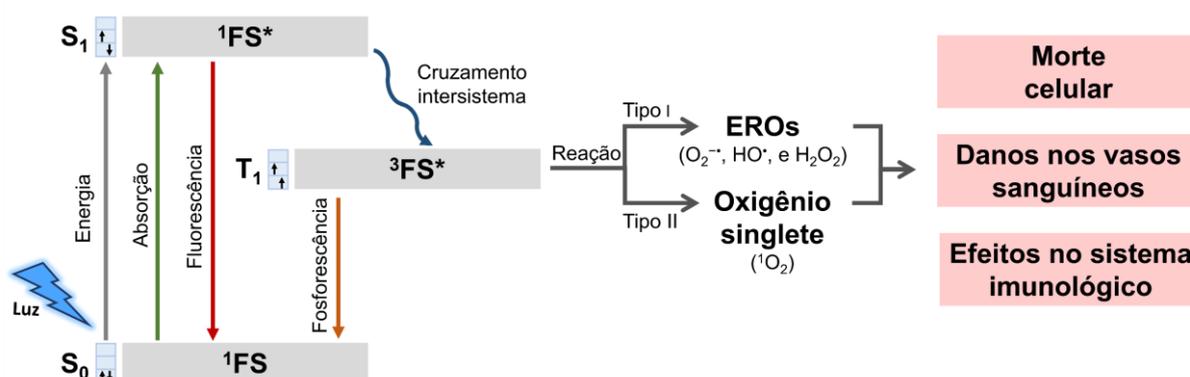


Fonte: adaptado de Correia et al. (2021).

A exposição do fotossensibilizador à luz a um comprimento de onda específico desencadeia dois tipos de reações fotoquímicas (tipo I e tipo II) que levam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Correia et al., 2021). Nesse processo os elétrons são excitados do estado fundamental ( $^1\text{FS}$ ) para o estado excitado singlete ( $^1\text{FS}^*$ ), que é muito instável (tempo de vida de nanossegundos;  $10^{-9}\text{ s}$ ) e podem decair para o estado fundamental e emitir luz (fluorescência). No entanto, um cruzamento intersistema (*intersystem crossing*) poderá ocorrer para formar um estado excitado tripleto ( $^3\text{FS}^*$ ), que é mais estável (tempo de vida de microssegundos;  $10^{-6}\text{ s}$ ) que o estado excitado singlete. Este estado excitado tripleto poderá decair para o estado fundamental através de emissão de luz (fosforescência) ou sofrer reações fotoquímicas. No ambiente biológico, o fotossensibilizador no estado excitado tripleto poderá interagir com biomoléculas e oxigênio molecular, e poderá sofrer reações de transferência de elétrons produzindo EROs (reação do tipo I) ou transferir energia para o oxigênio molecular no estado fundamental para gerar oxigênio singlete (reação do tipo II). As EROs, como oxigênio singlete, radical hidroxila, radical superóxido e peróxido de hidrogênio,

geram danos celulares e podem promover a morte celular (Correia et al., 2021; Aghajanzadeh et al., 2022; Kah et al., 2023). Na Figura 4, tem-se o diagrama de Jablonski simplificado para o processo da terapia fotodinâmica.

Figura 4 – Diagrama de Jablonski simplificado para o processo da terapia fotodinâmica



Fonte: adaptado de Correia et al. (2021) e Gunaydin et al. (2021).

As EROs produzidas durante o processo da terapia fotodinâmica podem induzir estresse celular e causar a morte celular por apoptose e necrose. Também podem danificar os vasos sanguíneos tumorais e da região circundante, interrompendo o suprimento de oxigênio e nutrientes, o que leva à morte celular por hipoxia. Além disso, a TFD pode induzir uma resposta inflamatória que ativará o sistema imunológico do paciente para atacar células cancerosas (Correia et al., 2021; Olszowy et al., 2023).

A ausência de um dos três componentes essenciais da TFD torna falho o processo, pois os elementos individualmente são inofensivos às células. Comparada à quimioterapia, a TFD apresenta a vantagem de toxicidade mínima aos tecidos normais, uma vez que os fotossensibilizadores são ativados apenas na área exposta à luz, o que permite um direcionamento para a área tumoral (Menilli et al., 2022; Aziz et al., 2023). Além disso, é menos invasiva que os procedimentos cirúrgicos e geralmente tem o custo menor que outras modalidades utilizadas no tratamento do câncer (Correia et al., 2021).

As fontes de luz utilizadas na TFD são lasers, lâmpadas e diodos emissores de luz (LEDs). Apesar dos LEDs serem menos potentes que os lasers, o interesse no seu uso tem crescido visto que são de baixo custo e disponíveis em matrizes flexíveis. Devido à limitada penetração da luz nos tecidos, a TFD é

promissora no tratamento de tumores superficiais e encontra desafios para tumores profundos. No entanto, ocorreram vários avanços nas técnicas de entrega de luz como uso de fibra óptica e cateter para direcionamento da luz para tumores grandes e profundos (Li et al., 2020; Correia et al., 2021).

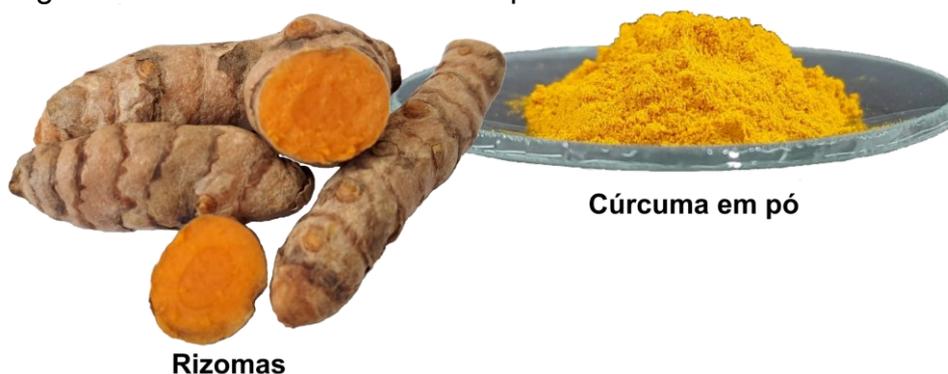
Os fotossensibilizadores (FS) são moléculas que apresentam um grupo cromóforo que absorve luz em determinado comprimento de onda com elevada absorvidade molar, desencadeando reações fotoquímicas. Dentre as características de um FS ideal para tratamento de câncer e outras doenças estão: ser facilmente obtido, ter propriedades químicas previamente estabelecidas na literatura, apresentar alta absorvidade molar na faixa de 600 – 800 nm (faixa em que a penetração da luz no tecido é máxima), não apresentar citotoxicidade em células saudáveis, entre outras (Kwiatkowski et al., 2018; Mansoori et al., 2019; Kah et al., 2023). Existem mais de 400 compostos que foram propostos como candidatos para uso como fotossensibilizadores e dentre os poucos que foram aprovados para aplicação clínica estão: porfímero sódico, ácido aminolevulínico (ALA), meta-tetra (hidroxifenil) clorina (m-thpc) e mono-L-aspartil clorina e6 (NP6e) (Aziz et al., 2023). Até o momento ainda não foi proposto nenhum FS que apresente todas as características ideais e estudos continuam sendo realizados para descobrir novos e mais eficazes FS (Aziz et al., 2023; Kah et al., 2023).

A curcumina é um composto natural polifenólico que se destaca por suas várias atividades farmacológicas e por sua propriedade fotossensibilizante, o que tem despertado o interesse da comunidade científica para uso na terapia fotodinâmica (Aziz et al., 2023; Kah et al., 2023).

#### **2.1.4 Curcumina**

*Curcuma longa* (conhecida como cúrcuma, açafrão, açafrão-da-terra, açafrão-da-índia e turmérico) é uma planta nativa da Índia que também tem sido cultivada em várias outras regiões do mundo, incluindo o Brasil. A parte do vegetal de maior interesse é o rizoma (Figura 5) que comumente é utilizado, na forma de pó (coloração amarelo-alaranjado), para fins culinários e médicos (Goel et al., 2008; Kotha; Luthria, 2019).

Figura 5 – Rizomas e cúrcuma em pó



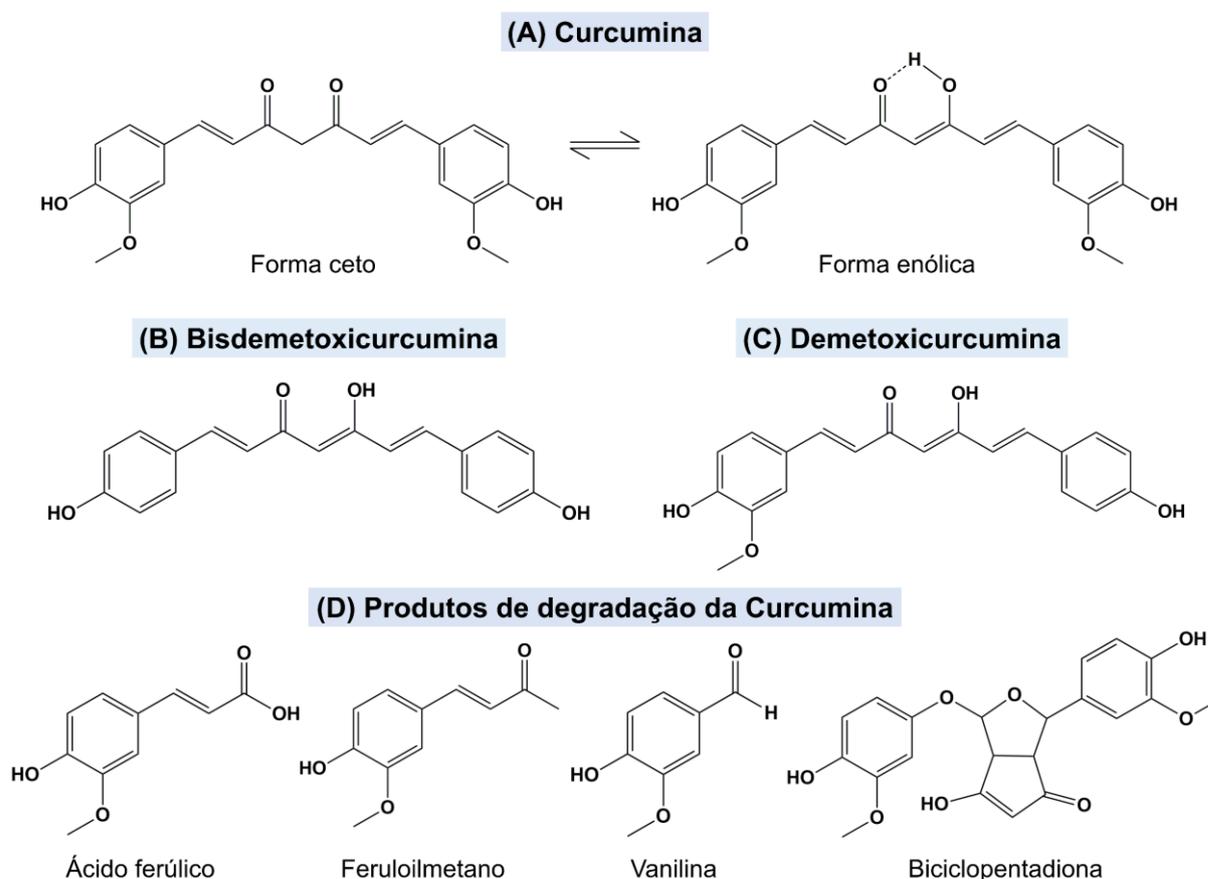
Fonte: elaborada pela autora.

Em sua composição química, estão presentes os curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina) que são compostos polifenólicos responsáveis pela coloração laranja dos rizomas (Goel et al., 2008). Dos três curcuminóides, a curcumina (Curcumina I; CUR) é a mais abundante na cúrcuma, seguida por demetoxicurcumina (Curcumina II; DMC) e bisdemetoxicurcumina (Curcumina III; BMC). Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 6A, 6B e 6C, respectivamente.

A curcumina comercial contém 75-80% de curcumina, 15-20% de demetoxicurcumina e 3-5% de bisdemetoxicurcumina (Peram et al., 2017; Kotha; Luthria, 2019; Sharifi-Rad et al., 2020). No geral, os termos curcumina, curcumina comercial e curcuminóides têm sido usados para representar todos os três curcuminóides (Rodrigues et al., 2015; Nelson et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2020).

A estrutura química da curcumina consiste em dois anéis aromáticos (substituídos com grupo orto-metoxila e hidroxila fenólica) interligados por uma porção  $\beta$ -dicetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada. Os três curcuminóides diferem na substituição de metoxi nos anéis aromáticos (Zheng; Mcclements, 2020).

Figura 6 – Estrutura química (A) da curcumina, (B) da demetoxicurcumina e (C) da bisdemetoxicurcumina, além (D) dos produtos de degradação hidrolítica e oxidativa da curcumina



Fonte: Elaborada pela autora.

A porção  $\beta$ -dicetona sofre tautomerização ceto-enólica, como representado na Figura 6A, e este equilíbrio é dependente das condições do ambiente (pH e polaridade do solvente). No estado sólido, em condições alcalinas, em solventes apolares (como clorofórmio;  $\text{CHCl}_3$ ) e polares apróticos (dimetilsulfóxido; DMSO), a forma enólica é predominante. Este tautômero é o mais estável, devido à presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e à sua planaridade que permite uma melhor conjugação eletrônica. Enquanto, em condições ácidas, neutras e em solventes polares próticos, o equilíbrio é parcialmente deslocado em direção ao tautômero ceto, e este é estabilizado por ligações de hidrogênio intermoleculares com o solvente (Manolova et al., 2014; Priyadarsini, 2014; Stanic, 2017).

A curcumina é praticamente insolúvel em solução aquosa ácida e neutra, mas é solúvel em solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona e DMSO. Em meio alcalino, a solubilidade da curcumina aumenta, porém ela degrada

rapidamente em condições neutra e alcalina (Kotha; Luthria, 2019; Zheng; McClements, 2020).

A degradação da curcumina ocorre por solvólise (reage com o solvente) ou processo de oxidação. A degradação hidrolítica leva a formação de ácido ferúlico, feruloilmetano e vanilina (Figura 6D), enquanto a degradação oxidativa produz a biciclo-pentadiona (Figura 6D) que é o principal produto de degradação da curcumina (Nelson et al., 2017; Zheng; McClements, 2020).

A curcumina e seus derivados apresentam diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, cardioprotetora, neuroprotetora e anticâncer (Sharifi-Rad et al., 2020; Zheng; McClements, 2020; Urošević et al., 2022). A atividade anticâncer da curcumina foi demonstrada por Kuttan et al. (1985), através de estudos *in vitro* e *in vivo* em câncer do sistema linfático.

Os efeitos anticancerígenos da curcumina, como inibição do crescimento das células cancerosas, supressão da angiogênese, supressão da metástase e indução de apoptose se devem a sua capacidade de afetar várias vias de sinalização celular, interferir no ciclo celular, inibir citocinas inflamatórias, proteínas quinase e fatores de transcrição (Deng et al., 2016; Xu et al., 2018; Ashrafizadeh et al., 2020). Vários estudos mostram que a curcumina apresenta atividade citotóxica contra diversas linhagens de células cancerosas, como de câncer de próstata (Boccellino et al., 2022), mama (Fabianowska-Majewska et al., 2021), colorretal (Ojo et al., 2022) e pulmão (Mo et al., 2021).

A curcumina também se destaca por apresentar propriedade fotossensibilizante, o que torna possível a sua utilização como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica (TFD). Seu espectro de absorção encontra-se na região de 300 a 500 nm com comprimento de onda de máxima absorção entre 405 e 435 nm, dependendo do solvente. Portanto, a luz azul (400 – 500 nm) é usada para ativá-la (Aziz et al., 2023; Kah et al., 2023).

A literatura científica tem reportado que a terapia fotodinâmica melhorou o efeito anticancerígeno da curcumina em várias linhagens de células cancerosas, como câncer de mama, pele, fígado, próstata e rins (Yang et al., 2020; Xie et al., 2022; Kah et al., 2023). O tratamento de células de câncer renal (KTCTL-26 e A498) com curcumina em baixa concentração e exposição à luz azul reduziu significativamente a viabilidade celular. A aplicação apenas da luz visível ou da

curcumina isolada não levou a diferenças significativas na proliferação celular em relação ao controle (Rutz et al., 2019).

Apesar dos seus vários efeitos terapêuticos, a aplicação clínica da curcumina é limitada, devido à sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e instabilidade química em condições fisiológicas (Nelson et al., 2017; Zheng; Mcclements, 2020). Na busca de contornar as inúmeras limitações que a curcumina e os quimioterápicos apresentam, vários sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia têm sido propostos visto que podem aumentar a biodisponibilidade e melhorar a eficácia terapêutica. Além disso, poderia reduzir a toxicidade ao minimizar a distribuição inespecífica dos quimioterápicos nos tecidos (Pan et al., 2019; Chang et al., 2021; Dizaj et al., 2022).

## **2.2 Nanopartículas**

A nanotecnologia farmacêutica tem ganhado crescente interesse nas últimas décadas como ferramenta de entrega de medicamentos para o tratamento contra o câncer e outras doenças (Palao-Suay et al., 2016; Yang et al., 2018; Nirmala et al., 2023).

A razão pela qual as nanopartículas são atraentes como sistemas de liberação de fármacos é baseada nas suas características únicas, como tamanho adequado para aplicação intravenosa, proteção do fármaco na corrente sanguínea, aumento do tempo de circulação sistêmica dos agentes terapêuticos e capacidade de promover uma liberação controlada do fármaco aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais (Lee; Yeo, 2015; Yang et al., 2018; Nirmala et al., 2023). Além disso, elas possibilitam uma melhor adesão do paciente ao tratamento, através da redução das doses e frequência da administração, mantendo os níveis do fármaco na faixa desejada (Lee; Yeo, 2015).

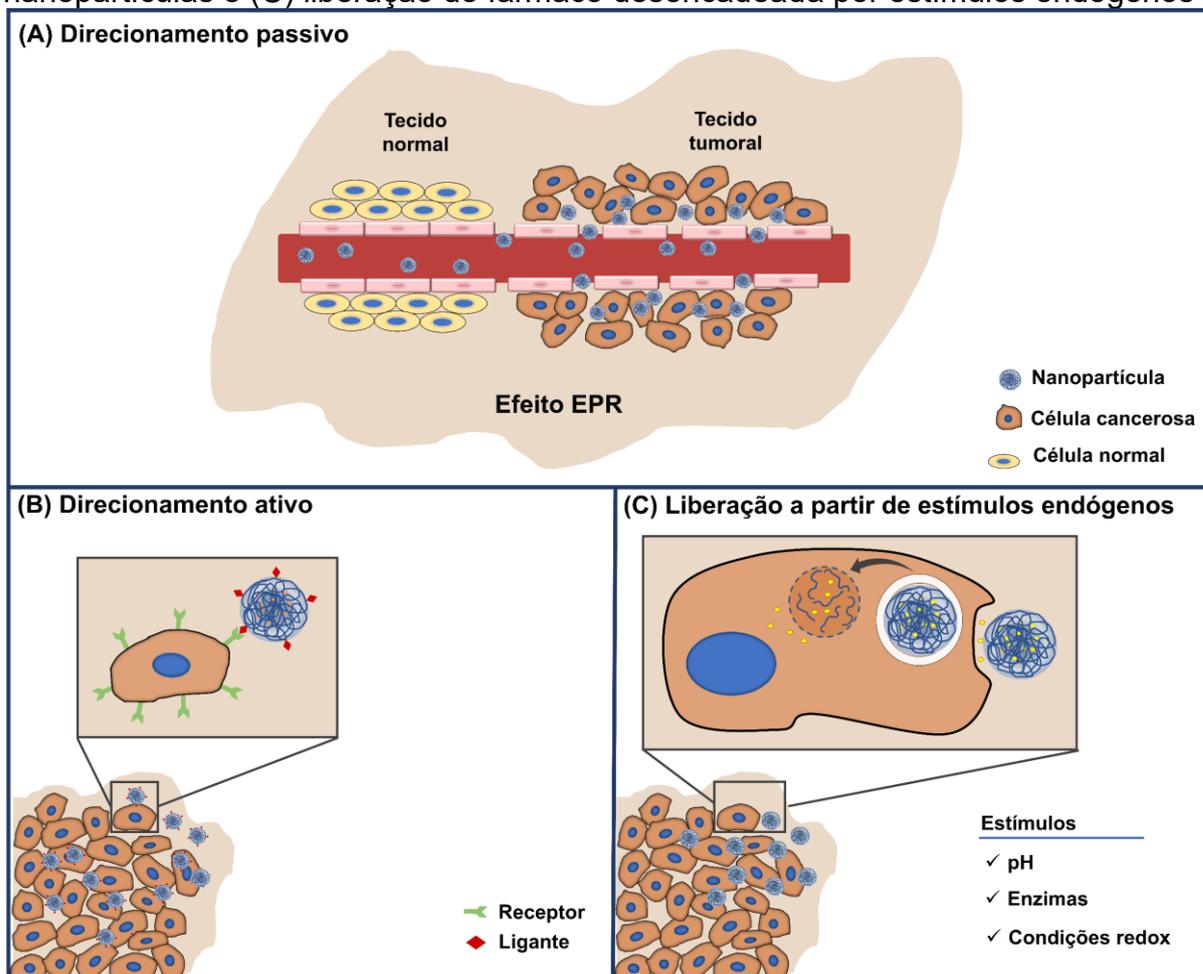
Os nanocarreadores de fármacos geralmente apresentam tamanhos na faixa de 10 – 1000 nm. Porém, dependendo da aplicação em locais específicos, os sistemas devem se adequar a uma faixa de tamanho definida (Khosa et al., 2018). Para aplicações intravenosas, as nanopartículas devem apresentar diâmetro médio entre 30 e 300 nm, visando um prolongamento do tempo de circulação sistêmica dos transportadores. Problemas como trombose e rápida eliminação pelo sistema reticuloendotelial (fígado, baço e medula óssea) podem ser causados por sistemas

com tamanhos maiores que 300 nm. Além disso, partículas menores que 10 nm devem ser evitadas, pois estão sujeitas à rápida eliminação pelos rins (Ferrari et al., 2018).

Tendo em vista as alterações na quantidade e tamanho dos poros dos vasos sanguíneos dos tecidos tumorais (500 – 1000 nm) em relação aos saudáveis (6 – 12 nm), muitos sistemas nanoparticulados com tamanhos menores que 200 nm têm sido projetados para acumular passivamente em tumores, fenômeno conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (Figura 7A) (Danaei et al., 2018; Alavi; Webster, 2021; Shi et al., 2023). Os nanocarreadores não são capazes de atravessar o endotélio normal rapidamente. Com isso o efeito EPR permite que as nanopartículas alcancem os tumores de forma mais seletiva que os fármacos livres, podendo promover uma minimização da toxicidade aos tecidos normais e aumento da eficácia terapêutica (Lee; Yeo, 2015; Nirmala et al., 2023).

Vários biomarcadores são especificamente ou altamente expressos na superfície de células cancerosas. Nanomateriais têm sido modificados com moléculas direcionadoras, ou seja, ligantes (anticorpos, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e ácido fólico) para serem reconhecidos seletivamente pelos receptores expressos nas células-alvo (células cancerosas), como ilustrado na Figura 7B (Dai et al., 2017; Nirmala et al., 2023; Shi et al., 2023). O direcionamento ativo tem sido desenvolvido para aumentar o acúmulo e absorção celular dos nanocarreadores no ambiente tumoral e promover uma liberação direcionada do fármaco, reduzindo danos às células normais (Attia et al., 2019; Chang et al., 2021).

Figura 7 – Ilustração esquemática (A) do efeito EPR, (B) direcionamento ativo de nanopartículas e (C) liberação de fármaco desencadeada por estímulos endógenos



Fonte: elaborada pela autora.

A fisiopatologia do tumor se manifesta com alterações no pH, atividade enzimática ou propriedades redox e estes fatores endógenos têm sido explorados como estímulos para desencadear uma liberação seletiva de fármacos a partir de nanocarreadores (Figura 7C) (Wang et al., 2018, 2022; Rodríguez et al., 2023). O crescente interesse por sistemas sensíveis ao pH deve-se ao meio mais ácido do microambiente tumoral quando comparado com tecidos saudáveis (pH 7,2–7,4). No microambiente extracelular de um tumor, os valores de pH são de 6,5 a 6,8, enquanto nos endossomos o meio é ainda mais ácido (pH de 5,5 a 6,5 no endossomo inicial e pH de 5,0 a 5,5 no endossomo tardio) (Wang et al., 2016). As células tumorais proliferam a uma taxa extremamente alta e a falta de nutrientes leva à aceleração da glicólise e ao acúmulo de ácido láctico, diminuindo o pH do meio, conhecido como efeito Warburg (Bellone et al., 2013; Zhou et al., 2018). Nanopartículas pH-responsivas devem permanecer estáveis na corrente sanguínea

minimizando a liberação prematura do fármaco. E ao atingir o microambiente tumoral a liberação do fármaco é desencadeada pela alteração do pH do meio (Chang et al., 2021). A acidez no microambiente tumoral complementa e estende a seletividade alcançada pelo efeito EPR (Wang et al., 2018).

Diversos nanocarreadores de fármacos sensíveis ao pH têm sido projetados utilizando ligações ácido-lábeis (hidrazona, imina, oxima e acetal) entre o fármaco e o polímero (conhecidos como conjugados polímero-fármaco ou pró-fármacos poliméricos) ou na composição estrutural do polímero promovendo uma liberação seletiva do fármaco (Wang et al., 2018; Wang et al., 2022; Chang et al., 2021). Polissacarídeos têm sido amplamente estudados como componentes de nanocarreadores de fármacos tendo em vista suas excelentes características como solubilidade em água, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e facilidade de modificação química (Yang et al., 2018; Plucinski et al., 2021; Petrovici et al., 2023).

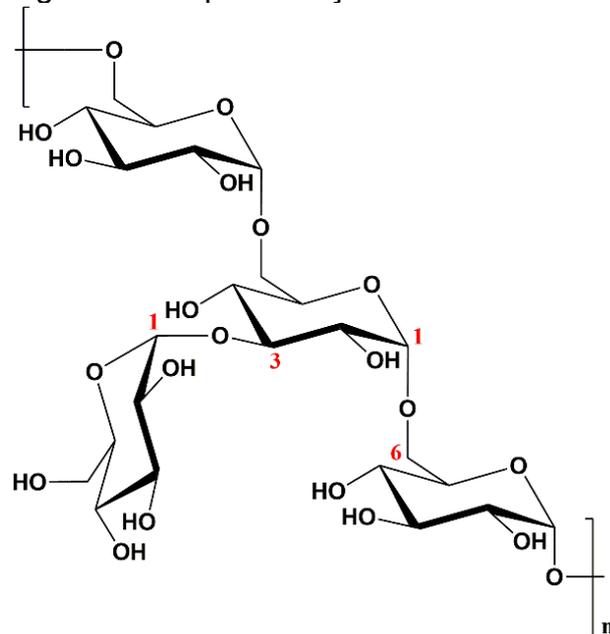
### 2.3 Dextrana e dextrana oxidada

Em 1861, Pasteur mostrou que o espessamento de xaropes de cana-de-açúcar era causado por ação microbiana e, em 1878, Tieghem nomeou a bactéria causadora de *Leuconostoc mesenteroides* (Pasteur, 1861; Tieghem, Van, 1878). Então, em 1874, Scheibler descobriu que esse aumento da viscosidade dos xaropes era causado pela presença de um carboidrato que foi nomeado dextrana (Scheibler, 1874). Várias bactérias lácticas dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* são conhecidas por sintetizar dextrana. Durante o processo fermentativo, a sacarose é convertida em dextrana pela ação da enzima dextrana-sacarase excretada pelas bactérias (Naessens et al., 2005).

A dextrana (DEX) é um homopolissacarídeo solúvel em água que apresenta cadeia principal de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -(1→6) e variadas quantidades de ramificações de D-glicose ligadas à cadeia principal por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1→3) e ocasionalmente  $\alpha$ -(1→2) e  $\alpha$ -(1→4), dependendo da cepa utilizada (Naessens et al., 2005; Siddiqui et al., 2014). Comercialmente, a dextrana é obtida a partir da fermentação da espécie *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F em meio com sacarose e contém aproximadamente 95% de ligações

glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) e 5% de ramificações ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Naessens et al., 2005; Siddiqui et al., 2014). Na Figura 8, tem-se uma representação estrutural da dextrana.

Figura 8 – Representação da estrutura da dextrana



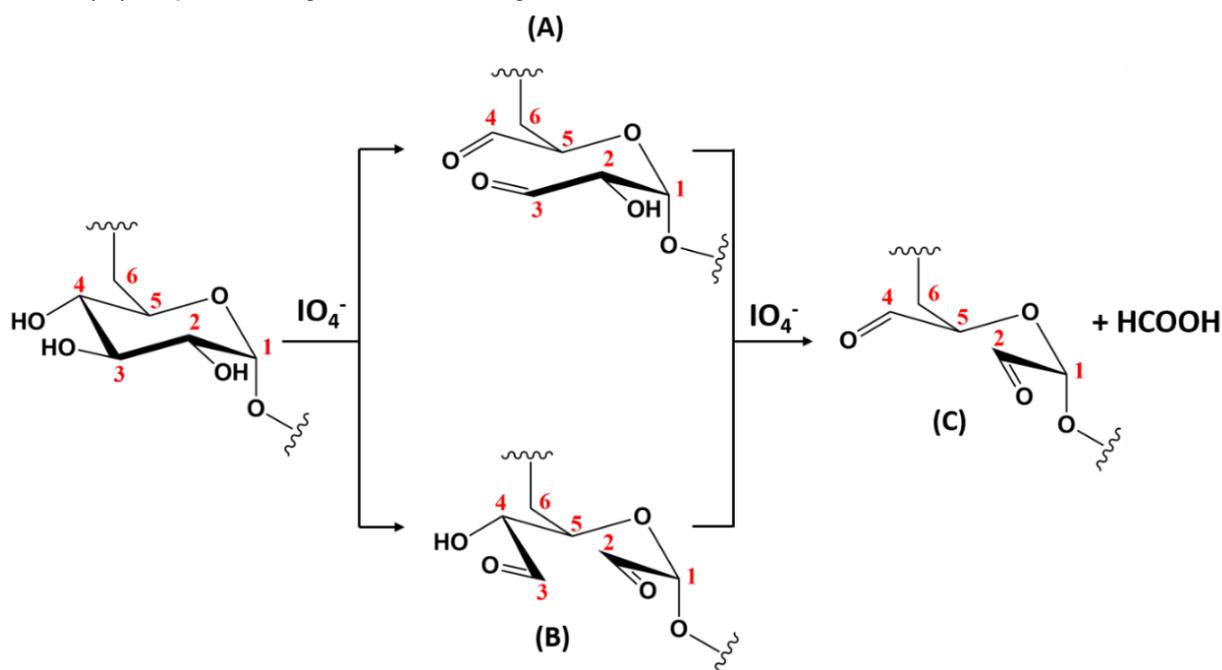
Fonte: elaborada pela autora.

Devido à sua solubilidade em água, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, a dextrana tem sido aplicada há mais de 50 anos como expansor de plasma sanguíneo e extensivamente estudada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (Raveendran et al., 2016; Chen et al., 2020; Petrovici et al., 2023). Dentre os sistemas de liberação de fármaco anticâncer desenvolvidos estão nanocarreadores (Grebinyk et al., 2022; Dong et al., 2023), microesferas (Rai et al., 2016) e hidrogéis (Huang et al., 2020; Fan et al., 2023).

A abundância de grupos hidroxila nas unidades glicosídicas possibilita a realização de diversas modificações químicas do polissacarídeo, ampliando suas funcionalidades e aplicações. A dextrana apresenta dióis vicinais com hidroxilas orientadas nas posições equatorial-equatorial, que podem ser oxidadas com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ), levando à formação de dois aldeídos por unidade glicosídica oxidada (dialdeídos). No geral, o íon periodato ataca os dióis vicinais rompendo as ligações  $\text{C}_2\text{-C}_3$  ou  $\text{C}_3\text{-C}_4$ , sendo possível a ocorrência de uma segunda oxidação com liberação de ácido fórmico (Figura 9). A clivagem

das ligações C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> ou C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> resulta em maior flexibilidade da cadeia (Kristiansen et al., 2010; Maia et al., 2011).

Figura 9 – Esquema da oxidação da dextrana com periodato de sódio. (A) Oxidação com formação de aldeídos nas posições C3 e C4, (B) formação de aldeídos em C2 e C3 e (C) dupla oxidação com liberação de ácido fórmico



Fonte: adaptado de Maia et al. (2011).

Os produtos dialdeídicos apresentam boa reatividade com N-nucleófilos, como aminas primárias ( $-\text{NH}_2$ ), hidrazinas ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) e hidroxilaminas ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) (Suvorova et al., 2001; Maia et al., 2011).

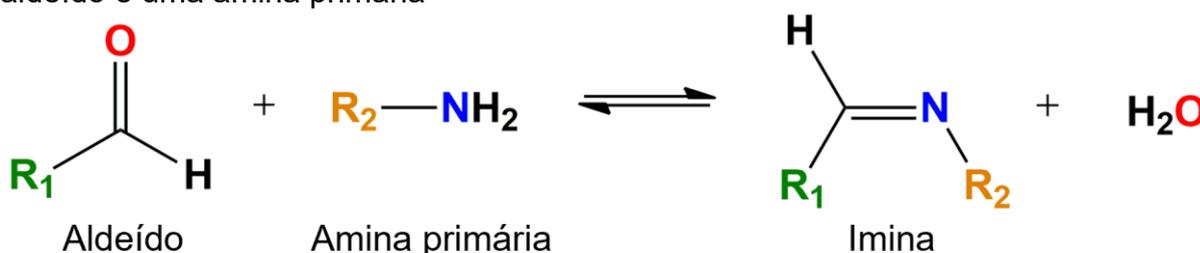
## 2.4 Base de Schiff

A reação de formação de base de *Schiff* foi descoberta pelo químico alemão Hugo Schiff, no ano de 1864, e refere-se à reação de aldeídos e cetonas com um grupo amino (aminas primárias, hidroxilamina, hidrazina, entre outros) resultando em um produto com ligação C=N (Figura 10). Produtos obtidos a partir de aminas primárias são denominados como iminas, a partir de hidroxilamina como oximas e a partir de hidrazinas como hidrazonas (Xin; Yuan, 2012; Xu et al., 2019).

A base de *Schiff* é uma ligação covalente dinâmica, pois é reversível com a variação do pH, o que a torna interessante na síntese de materiais estímulo responsivos (Feng et al., 2017; Lima et al., 2021; Tian et al., 2023). Em solução

aquosa com pH abaixo de 6,5, a ligação imina formada a partir de aminas primárias e aldeídos é desfeita, enquanto acima deste valor a base de *Schiff* é considerada estável. Uma vantagem dessa reação é que sua síntese é possível com a simples mistura e agitação dos reagentes (Xin; Yuan, 2012).

Figura 10 – Reação global de formação de iminas (base de *Schiff*) a partir de um aldeído e uma amina primária



Fonte: elaborada pela autora.

Devido a facilidade de síntese e sensibilidade do produto ao pH, a reação de formação de base de *Schiff* desperta atenção no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos anticâncer (Jia; Li, 2015; Xu et al., 2019; Tian et al., 2023). Ligações imina entre o fármaco e o polímero, ou na composição estrutural do polímero, podem promover uma liberação seletiva do medicamento nos tecidos tumorais, visto que apresentam um ambiente mais ácido que os tecidos saudáveis. A integridade estrutural das bases de *Schiff* é mantida em condições fisiológicas, enquanto em condições ácidas a conjugação de fármacos pode ser desfeita e transportadores podem ser desmontados propiciando a liberação seletiva do fármaco (Feng et al., 2017; Curcio et al., 2020; Tian et al., 2023).

Feng et al. (2017) propuseram um pro-fármaco polimérico através da conjugação de dextrana oxidada com o fármaco anticâncer doxorubicina via reação de formação de base de *Schiff*. O conjugado mostrou-se sensível ao pH, promovendo maior liberação do fármaco em meio ácido. Os resultados de captação celular, citotoxicidade e inibição da proliferação tumoral mostraram que o pró-fármaco era mais eficaz que o fármaco livre.

Curcio et al. (2020) conjugaram a doxorubicina, via reação de formação de base de *Schiff*, em dextrana oxidada acoplada com ácido lipóico e obtiveram vesículas hemocompatíveis com propriedades de liberação de DOX responsiva a variação de pH e potencial de redução. A camptotecina foi encapsulada nas vesículas e ensaios citotóxicos revelaram um aumento do efeito anticâncer.

Tian et al. (2023) sintetizaram pró-fármacos de dextrana conjugada com doxorubicina acoplados com anticorpo monoclonal CD147 para entrega de DOX às células cancerosas via direcionamento ativo. A doxorubicina e o anticorpo foram conjugados à dextrana oxidada via reação de formação de base de *Schiff* e as nanopartículas obtidas mostraram uma liberação pH-responsiva. Os resultados de citotoxicidade *in vitro* e ensaios de avaliação *in vivo* da eficácia antitumoral indicaram que os nanossistemas pH-responsivos preparados tinham maior segurança e efeitos de direcionamento, em comparação ao fármaco livre.

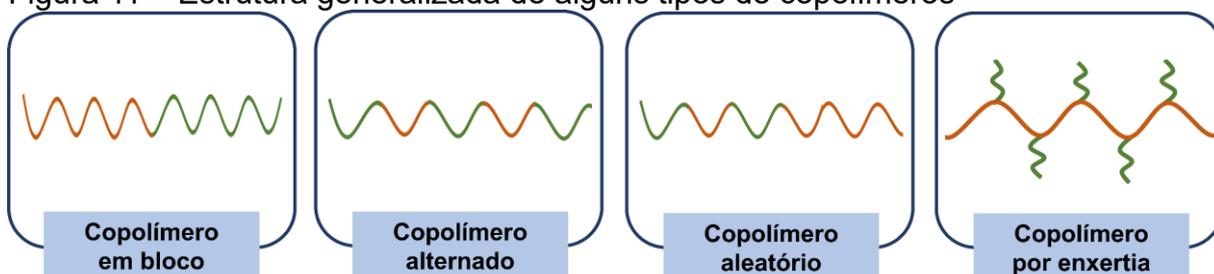
A reação de formação de base de *Schiff* também tem sido utilizada na síntese de copolímeros por enxertia. Carboximetilcelulose oxidada foi enxertada com metoxi polietilenoglicol amino terminado e dodecilamina por Bordallo et al. (2015). Nanopartículas auto-organizadas com potencial para transporte de fármacos hidrofóbicos foram preparadas e caracterizadas.

Lima et al. (2021) preparam copolímeros de galactomanana enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) via reação de formação de base de *Schiff* com propriedades promissoras para carreamento de fármacos, principalmente por conjugação com moléculas que possuem grupos amino em suas estruturas.

## 2.5 Copolímeros por enxertia

Copolímeros são polímeros constituídos por diferentes unidades de repetição e, de acordo com o arranjo dos monômeros na cadeia, eles podem ser classificados como em bloco, alternado, aleatório e por enxertia (Figura 11) (Odian, 2004).

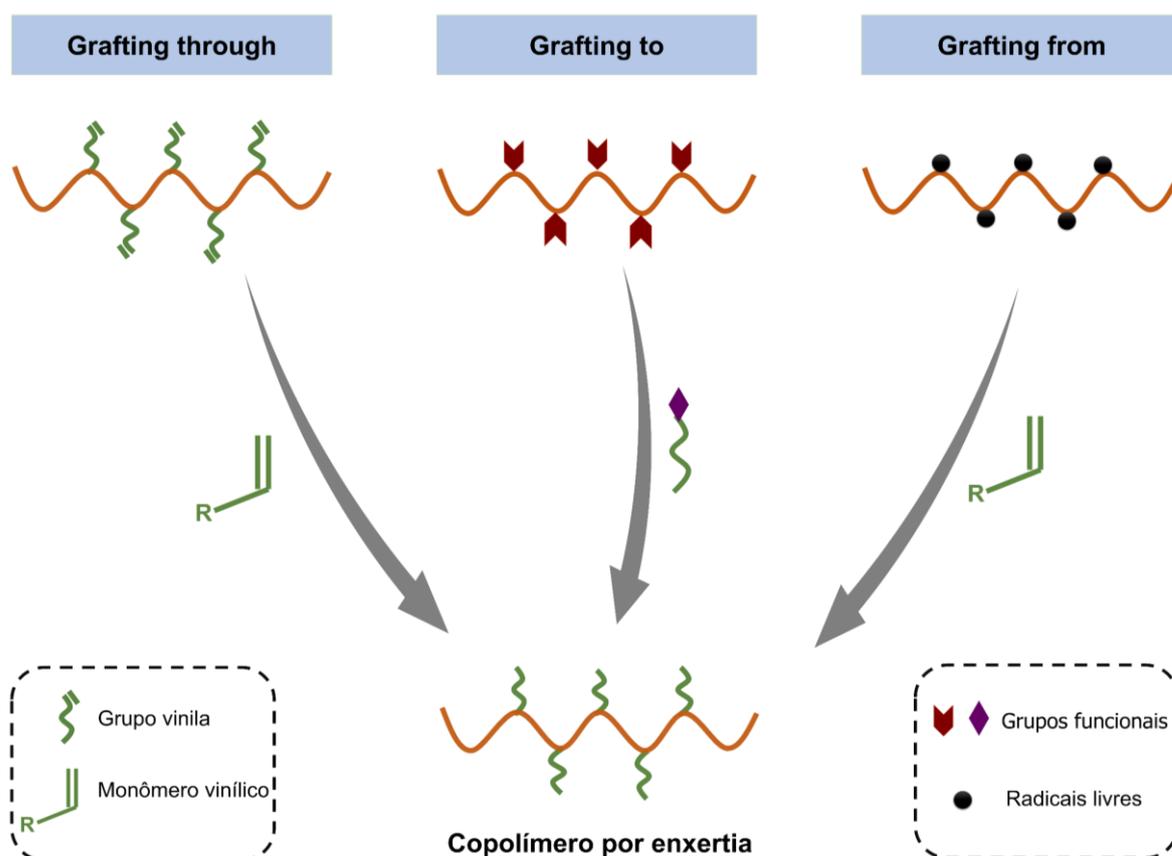
Figura 11 – Estrutura generalizada de alguns tipos de copolímeros



Fonte: elaborada pela autora.

Os copolímeros por enxertia são constituídos por uma cadeia principal de um polímero e cadeias laterais de outro polímero, unidos por ligação covalente (Alexandridis, 1996). No geral, copolímeros por enxertia podem ser sintetizados por três principais estratégias: “*grafting through*”, “*grafting from*” e “*grafting to*” (Figura 12).

Figura 12 – Ilustração esquemática das principais estratégias de síntese de copolímeros por enxertia



Fonte: elaborada pela autora.

Na abordagem “*grafting through*” macromônômeros funcionalizados com grupos vinila são copolimerizados com monômeros vinílicos de baixa massa molar. Na “*grafting from*” sítios ativos são criados na cadeia principal e a partir destes ocorre o crescimento das cadeias laterais. Enquanto, na estratégia “*grafting to*” os copolímeros são formados a partir de reações de acoplamento entre grupos funcionais presentes na cadeia principal e grupos terminais reativos das cadeias laterais pré-formadas. Este último método tem a vantagem de controle do tamanho das cadeias laterais e possibilidade de caracterização da cadeia principal e das

cadeias laterais, antes das reações de acoplamento (Atanase et al., 2017; Seidi et al., 2018; Jarosz et al., 2019).

Copolímeros por enxertia constituídos por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos têm propriedades anfífilas. Estes podem se auto-organizar em nanopartículas em solução aquosa após a concentração de associação crítica (CAC), concentração mínima de copolímeros necessária para formação das nanopartículas (Atanase et al., 2017). O processo de auto-organização é espontâneo e dirigido por interações não covalentes, como força de Van der Waals e ligações de hidrogênio que mantêm a estabilidade e integridade das nanopartículas (Lim, 2012). As nanopartículas formadas geralmente possuem o núcleo hidrofóbico e a camada externa hidrofílica, o que permite o encapsulamento de agentes terapêuticos hidrofóbicos (Gomes et al., 2020; Lima et al., 2021; Santos et al., 2023).

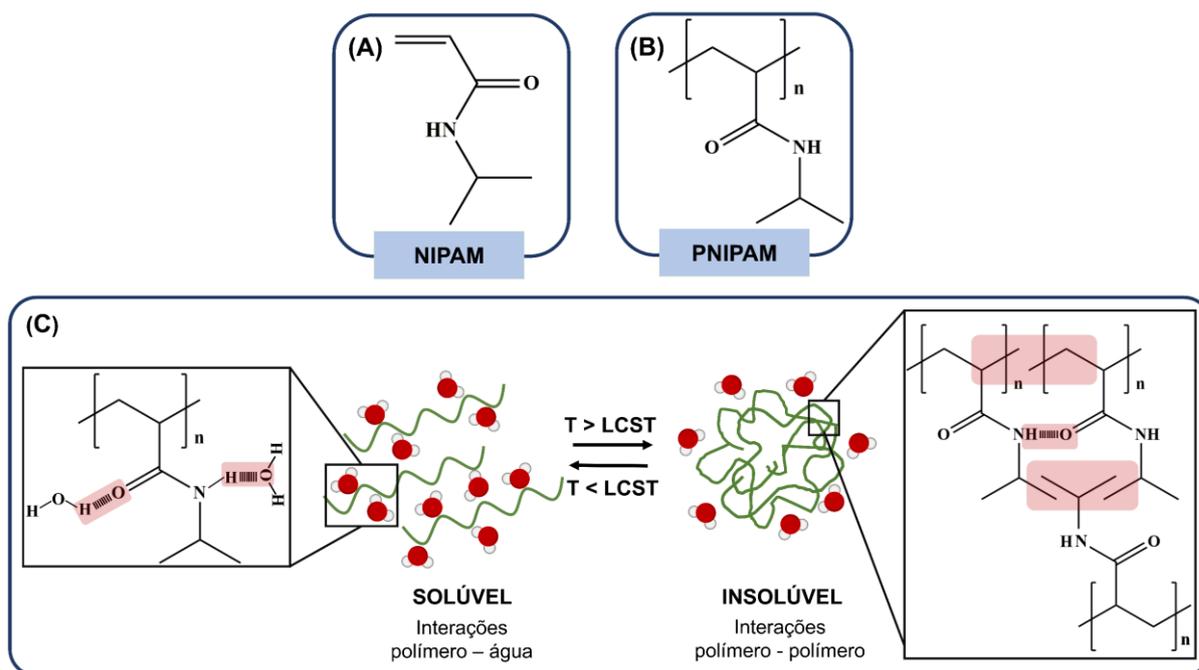
Um caso específico são os copolímeros “duplamente hidrofílicos” (possuem apenas segmentos hidrofílicos) que adquirem características anfífilas quando estímulos externos são aplicados, como temperatura, pH, força iônica e luz (Atanase et al., 2017; Tu et al., 2018; Lima et al., 2021).

## **2.6 Poli(N-isopropilacrilamida)**

Polímeros que alteram sua estrutura e propriedades em função de estímulos externos, como temperatura, pH, força iônica e luz, são conhecidos como polímeros inteligentes (Qiu; Hu, 2013; Aguilar; Román, 2014).

O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) (Figura 13A) é um polímero inteligente, obtido a partir da polimerização do monômero N-isopropilacrilamida (NIPAM) (Figura 13B), e foi reportado pela primeira vez em 1968, por Heskins e Guillet (1968). Em meio aquoso, o PNIPAM apresenta característica termoresponsiva, sua solubilidade diminui com o aumento da temperatura do meio. A temperatura em que ocorre a transição de fase desse polímero é em torno de 32 °C, característica que tem despertado interesse científico em vários estudos que visam aplicações biomédicas, visto que é uma temperatura próxima a do corpo humano (Schild, 1992; Bordat et al., 2019). O desenvolvimento de sistemas para entrega de fármacos e para engenharia de tecidos são destaque entre as aplicações biomédicas do PNIPAM (Ansari et al., 2022; Santos et al., 2023) .

Figura 13 – Fórmula estrutural (A) do monômero vinílico NIPAM, (B) do seu polímero PNIPAM e (C) ilustração da propriedade termoresponsiva do PNIPAM



Fonte: elaborada pela autora.

O PNIPAM exibe um comportamento do tipo LCST (*Lower Critical Solution Temperature*), pois em temperaturas abaixo de 32 °C ele é solúvel em água, ou seja, as ligações de hidrogênio entre o polímero e as moléculas de água predominam, em relação às interações entre as moléculas do polímero. Em temperaturas mais elevadas, as ligações de hidrogênio intermoleculares e as interações entre os segmentos hidrofóbicos do PNIPAM são favorecidas, acarretando a desidratação e hidrofobização das cadeias poliméricas (Figura 13C) (Chen et al., 2015; Pasparakis; Tsitsilianis, 2020).

Do ponto de vista termodinâmico ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ), em temperaturas abaixo da LCST a entalpia de solubilização ( $\Delta H$ ) é negativa devido à formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e polímero. Esse processo leva a um sistema mais organizado com variação da entropia negativa ( $\Delta S < 0$ ). Nesta fase, o termo entálpico é predominante e a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é negativa, o que proporciona a dissolução do PNIPAM. Acima da LCST, ocorre o fortalecimento das interações entre os segmentos hidrofóbicos do polímero, levando a um  $\Delta H$  menos negativo e um ganho entrópico. Nesta fase, o termo entrópico predomina e o  $\Delta G$  é positivo, ocorrendo a desidratação e formação de agregados com conformação globular compacta (Pasparakis; Tsitsilianis, 2020; Tang et al., 2021).

O valor da temperatura de transição depende de diversos fatores como massa molar, concentração, força iônica e equilíbrio entre os segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Ao copolimerizar o PNIPAM com segmentos de caráter hidrofílico, a LCST pode ser aumentada, enquanto a LCST é reduzida ao copolimerizar com segmentos hidrofóbicos (Almeida et al., 2012; Lencina et al., 2014).

A copolimerização do PNIPAM tem sido explorada em diversos polissacarídeos, como dextrana (Yeshchenko et al., 2022), dextrana sulfatada (Santos et al., 2023), goma do cajueiro (Abreu et al., 2016), galactomanana (Lima et al., 2021) e quitosana (Babelyte et al., 2023).

Copolímeros por enxertia à base de dextrana e poli(N-isopropilacrilamida) têm sido sintetizados por polimerização via radicais livres utilizando como iniciador nitrato de amônio cérico IV (CAN), polimerização radicalar controlada por transferência de átomo (ATRP) e por reação de acoplamento utilizando química de carbodiimidas (Tabela 1). Dentre as propostas de aplicação, destacam-se o carregamento de fármacos.

A síntese de copolímeros por enxertia via reação de formação de base de *Schiff* tem sido pouco explorada, principalmente a enxertia do PNIPAM em polissacarídeos. Nosso grupo de pesquisa reportou a preparação de copolímeros à base de galactomanana e PNIPAM por esse tipo de reação com potencial para carregamento de fármacos (Lima et al., 2021). A enxertia de PNIPAM em dextrana por essa rota desperta atenção devido a possibilidade de obtenção de copolímeros de forma simples com propriedades como termossensibilidade e resposta ao pH. Essas características potencializam sua aplicação como sistemas de carregamento de agentes terapêuticos, como doxorubicina e curcumina, para uso na terapia combinada contra o câncer.

Tabela 1 – Copolímeros por enxertia à base de dextrana e PNIPAM sintetizados por diferentes rotas de síntese

<b>Rota de síntese</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Apresentação do copolímero</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<b>Polimerização via radicais livres</b>	CAN <sup>1</sup>	-	Potencial para aplicação biomédica	YESHCHENKO et al. (2022)
		Nanopartícula	Carreamento do fármaco anticâncer doxorubicina	CHERNYKH et al. (2021)
		-	Potencial para aplicação biomédica	CHUMACHENKO et al. (2017)
		Nanopartícula	Carreamento do fármaco anti-inflamatório indometacina	TAN et al. (2011)
<b>Química de carbodiimidas</b>	EDC <sup>2</sup> /NHS <sup>3</sup>	Micela	-	WANG et al. (2002)
		Hidrogel	-	ZHANG (2005)
		-	Ferramenta para purificar anticorpos policlonais	ANASTASE-RAVION et al. (2001)
<b>ATRP<sup>5</sup></b>	EDC	Hidrogel	Potencial para aplicação biomédica	HUH et al. (2000)
		Micela	Carreamento do fármaco anticâncer metotrexato	BLANCO-FERNANDEZ et al. (2017)
		Nanopartícula	Carreamento de hemoglobina	WANG et al. (2014)
		Nanopartícula	Potencial para aplicação biomédica	PATRIZI et al. (2009)
	CuBr <sup>6</sup>	Micela	Carreamento do fármaco anticâncer metotrexato	BLANCO-FERNANDEZ et al. (2017)
	CuCl <sup>7</sup>	Nanopartícula	Carreamento de hemoglobina	WANG et al. (2014)
	CuCl	Nanopartícula	Potencial para aplicação biomédica	PATRIZI et al. (2009)
	CuBr	Microesfera	Potencial microtransportador para culturas de células	KIM et al. (2003)

<sup>1</sup>CAN: Nitrato de amônio cérico IV. <sup>2</sup>EDC: Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. <sup>3</sup>NHS: N-Hidroxisuccinimida. <sup>4</sup>DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida. <sup>5</sup>ATRP: Polimerização radicalar controlada por transferência de átomo. <sup>6</sup>CuBr: Brometo de cobre (I). <sup>7</sup> CuCl: Cloreto de cobre (I).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de dextrana enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) via reação de formação de base de *Schiff* para uso na terapia combinada contra o câncer.

#### 3.2 Objetivos específicos

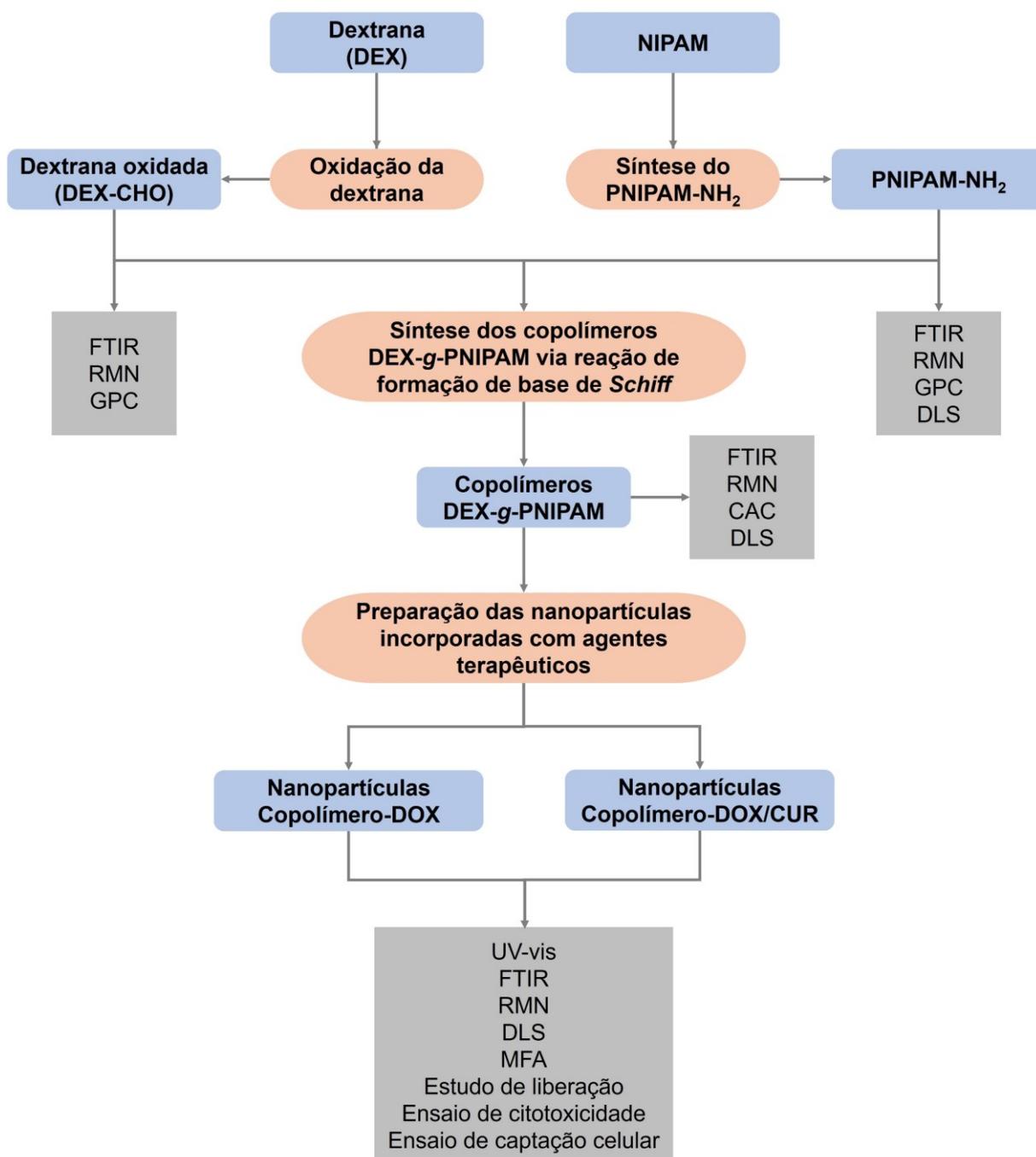
- Investigar a influência da massa molar da dextrana oxidada e do PNIPAM-NH<sub>2</sub> nas propriedades de copolímeros por enxertia sintetizados via reação de formação de base de *Schiff* (concentração de associação crítica, temperatura de transição, tamanho de partículas e sensibilidade ao pH);
- Analisar as características químicas, físicas e morfológicas de nanopartículas de dextrana-g-PNIPAM carregadas com o fármaco doxorrubicina via reação de formação de base de *Schiff* e de nanopartículas co-incorporadas com doxorrubicina e curcumina;
- Verificar o efeito da variação do pH do meio no percentual de liberação de doxorrubicina e curcumina das nanopartículas;
- Comparar a estabilidade química da curcumina livre e incorporada nas nanopartículas;
- Investigar o efeito da monoterapia e da combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica na citotoxicidade das nanopartículas em células não-tumoral e cancerosa.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma metodológico

Na Figura 14, pode-se observar um fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho.

Figura 14 – Fluxograma metodológico do trabalho



Fonte: elaborada pela autora.

## 4.2 Materiais

Dextranas com massas molares ponderais médias ( $M_w$ ) de  $4,5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  (DEX<sub>45k</sub>) e  $3,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  (DEX<sub>310k</sub>) determinadas por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, Size-Exclusion Chromatography) foram adquiridas da Sigma-Aldrich e Pharmacia, respectivamente. O monômero N-isopropilacrilamida (NIPAM), persulfato de potássio (KPS), cloridrato de 2-aminoetanotiol (AET·HCl), pireno, cloridrato de doxorubicina (DOX·HCl), curcumina (obtida da *Curcuma longa*; 81%) e trietilamina (TEA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O reagente lauril sulfato de sódio (LSS) foi adquirido da Vetec. Acetona, hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), dimetilsulfóxido (DMSO), cloridrato de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH·HCl), etilenoglicol e periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) foram obtidos da Synth. O Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foi adquirido da Vitrocell e o soro fetal bovino foi comprado da Cultiab. Os antibióticos penicilina e estreptomicina foram obtidos da Cytiva.

## 4.3 Oxidação da dextrana

A reação de oxidação parcial da dextrana foi realizada utilizando o periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) como agente oxidante e foi baseada na metodologia proposta por Maia et al. (2011), com modificações. A dextrana (2,0 g;  $1,23 \times 10^{-2}$  mol de unidade glicosídica) foi dissolvida em 400 mL de água destilada, sob agitação magnética por 24 h. Em seguida, adicionou-se 0,79 g de NaIO<sub>4</sub> para se obter um grau de oxidação teórico de 30%. A reação prosseguiu sob agitação magnética (200 rpm) por 6 h, à temperatura ambiente e protegida da luz. Para finalizar a reação, adicionou-se etilenoglicol. O meio reacional foi dialisado contra água destilada em membrana com limite de exclusão de  $14\ 000 \text{ g mol}^{-1}$  e liofilizado. Dextranas oxidadas (DEX-CHO) obtidas a partir de DEX<sub>45k</sub> e DEX<sub>310k</sub> foram denominadas DEX<sub>45k</sub>-CHO e DEX<sub>310k</sub>-CHO.

### 4.3.1 Determinação do grau de oxidação (GO)

O grau de oxidação (GO), ou seja, percentual de unidades glicosídicas oxidadas foi determinado por titulação potenciométrica, utilizando o cloridrato de

hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ) para converter os aldeídos em oximas ( $\text{C}=\text{N}-\text{OH}$ ), mediante liberação de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) (Zhao; Heindel, 1991). Uma massa de 50 mg de DEX-CHO foi dissolvida em 25 mL de solução de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e deixou-se reagir por 24 h, à temperatura ambiente. Após, titulou-se com NaOH padronizado ( $0,099 \text{ mol L}^{-1}$ ) e calculou-se o GO a partir da equação 1. Dextrana não modificada foi utilizada como referência.

$$GO = \frac{162 \times V \times c \times 10^{-3}}{2m} \times 100\% \quad (1)$$

Onde:  $V$  é volume da solução de NaOH consumido no ponto de equivalência, em mL;  $c$  é a concentração da solução de NaOH, em  $\text{mol L}^{-1}$ ;  $m$  é a massa de DEX-CHO, em gramas e 162 é a massa molar da unidade glicosídica, em  $\text{g mol}^{-1}$ .

#### 4.4 Síntese do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino (PNIPAM-NH<sub>2</sub>)

O PNIPAM-NH<sub>2</sub> foi sintetizado por polimerização radicalar dos monômeros de N-isopropilacrilamida (NIPAM) em meio aquoso utilizando o persulfato de potássio (KPS) como iniciador e o cloridrato de 2-aminoetanol (AET·HCl) como agente de transferência de cadeia (Bokias et al., 2001; Gupta et al., 2011).

Inicialmente, 5,66 g de NIPAM (50 mmol) foram dissolvidas em 80 mL de água destilada e gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) foi borbulhado por 30 min na solução. O KPS (148 mg; 0,55 mmol) e o AET·HCl (0,5 ou 1 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de água destilada, desaerados separadamente e depois adicionados à solução do monômero. Deixou-se a reação prosseguir sob agitação magnética (200 rpm) por 6 h, à 30 °C e em atmosfera de  $\text{N}_2$ . Por fim, o meio reacional foi dialisado contra água destilada e liofilizado. A fim de obter PNIPAM-NH<sub>2</sub> com diferentes massas molares utilizou-se duas razões molares de AET·HCl/monômero (0,01 e 0,02). As massas molares ponderais médias ( $M_w$ ) dos polímeros foram determinadas por SEC,  $3,0 \times 10^4$  e  $1,7 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , e denominados PNIPAM<sub>30k</sub> e PNIPAM<sub>17k</sub>, respectivamente.

#### 4.4.1 Determinação da quantidade de grupos amino ( $\text{NH}_2$ )

A quantidade de grupos amino por grama de PNIPAM- $\text{NH}_2$  foi determinada por titulação potenciométrica ácido-base (Lencina et al., 2014). Uma massa de 0,25 g de PNIPAM- $\text{NH}_2$  foi dissolvida em 10 mL de água destilada e, NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  adicionado até  $\text{pH} \geq 11$  para completa desprotonação dos grupos amino. Em seguida, a solução foi titulada com solução de HCl padronizado (0,0083 mol  $\text{L}^{-1}$ ).

#### 4.5 Síntese dos copolímeros dextrana-g-poli(N-isopropilacrilamida) via reação de formação de base de Schiff

A síntese dos copolímeros foi realizada via reação de formação de base de Schiff entre o grupo amino terminal do PNIPAM- $\text{NH}_2$  e os grupos aldeído da DEX-CHO, de acordo com a metodologia descrita por Lima et al. (2021). Poli(N-isopropilacrilamida) amino terminado (0,075 g) e dextrana oxidada (0,075 g) foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. A solução de PNIPAM- $\text{NH}_2$  foi vertida na solução de DEX-CHO e a reação prosseguiu sob agitação magnética (150 rpm) por 24 h e à temperatura ambiente. Posteriormente, foi seca por liofilização.

A fim de purificar os copolímeros, estes foram dispersos em acetona (100 mg de copolímero em 50 mL de acetona) sob agitação magnética, por 48 h. Os copolímeros purificados, que são insolúveis em acetona, foram separados do PNIPAM- $\text{NH}_2$  (solúvel em acetona) que não reagiu, por centrifugação a 10 000 rpm. Por fim, os copolímeros purificados foram dissolvidos em água e liofilizados. Três copolímeros foram sintetizados variando a massa molar da dextrana de partida e do PNIPAM- $\text{NH}_2$  e foram denominados  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ ,  $\text{D}_{310\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$  e  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{17\text{k}}$ .

#### 4.5.1 Rendimento da reação de enxertia ( $\text{RE}\%$ )

O rendimento das reações de enxertia foi calculado a partir da equação 2.

$$\text{RE}(\%) = \frac{m_{\text{CP}}}{m_{\text{DEX-CHO}} + m_{\text{PNIPAM-NH}_2}} \times 100\% \quad (2)$$

Onde:  $m_{CP}$  é a massa de copolímero purificado;  $m_{DEX-CHO}$  é a massa adicionada de dextrana oxidada e  $m_{PNIPAM-NH_2}$  é a massa adicionada de poli(N-isopropilacrilamida) amino terminado em grama.

#### 4.6 Preparação das nanopartículas copolímero-DOX

Nanopartículas de copolímero-DOX foram preparadas de acordo com Zhang et al. (2016), com modificações. Inicialmente, uma solução estoque de doxorubicina desprotonada foi preparada dissolvendo DOX·HCl (20 mg) em 2 mL de DMSO e 25  $\mu$ L de trietilamina. Posteriormente, 10 mg de copolímero foram dissolvidos em DMSO (9,9 ou 9,8 mL) e, então, 100 ou 200  $\mu$ L de solução estoque de DOX desprotonada foram adicionados ao balão. O sistema foi mantido a 40 °C, sob agitação magnética (150 rpm) por 24 h e protegido da luz. Em seguida, o meio reacional foi dialisado contra água destilada por 72 h e liofilizado. Foram preparadas nanopartículas com carga teórica de DOX de 10% (m/m) (D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1) e 20% (m/m) (D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2).

A quantidade de DOX nas nanopartículas foi determinada por espectrofotometria na região do UV-vis ( $\lambda_{abs} = 502$  nm; UV-1800, Shimadzu) utilizando uma curva de calibração (3) em DMSO (APÊNDICE B).

$$Abs = 0,02173[DOX] - 0,03605 \quad R^2 = 0,9994 \quad (3)$$

Onde: Abs é absorvância e [DOX] é concentração de doxorubicina.

A eficiência de carregamento de fármaco (ECF) e a carga de fármaco (CF) foram calculados a partir das equações (4) e (5), respectivamente.

$$ECF (\%) = \frac{\text{massa de fármaco nas nanopartículas}}{\text{massa de fármaco adicionado}} \times 100\% \quad (4)$$

$$CF (\%) = \frac{\text{massa de fármaco nas nanopartículas}}{\text{massa de nanopartículas}} \times 100\% \quad (5)$$

#### 4.7 Preparação das nanopartículas copolímero-DOX/CUR

A incorporação da curcumina nas nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 foi realizada de acordo com Gao et al. (2017), com modificações. Inicialmente, 10 mg de D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 e curcumina, 10 ou 20% (m/m), foram dissolvidos em 2 mL de DMSO. A solução foi gotejada em 10 mL de água destilada e deixada sob agitação magnética lenta (50 rpm) por 1 h. Em seguida, a solução foi dialisada contra água destilada e liofilizada. As nanopartículas preparadas foram denominadas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR1 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2, com carga teórica de CUR de 10 e 20% (m/m), respectivamente.

A quantidade de CUR nas nanopartículas foi determinada por espectrofotometria na região do UV-vis ( $\lambda_{\text{abs}} = 435 \text{ nm}$ ; UV-1800, Shimadzu) utilizando uma curva de calibração (6) em DMSO.

$$\text{Abs} = 0,1474[\text{CUR}] - 0,0402 \quad R^2 = 0,9988 \quad (6)$$

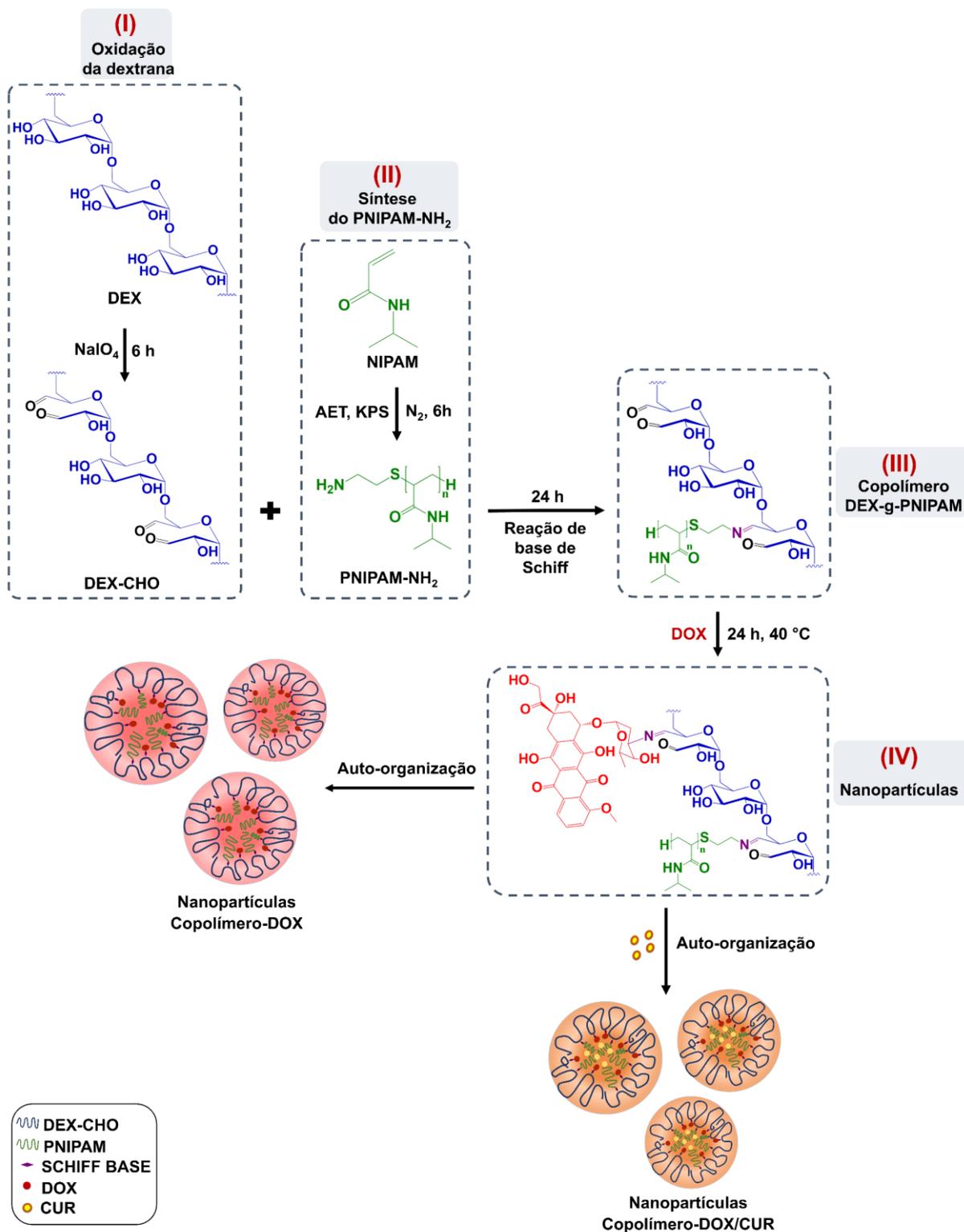
Onde: Abs é absorvância e [CUR] é concentração de curcumina.

A eficiência de carregamento de fármaco (ECF) e a carga de fármaco (CF) foram calculados a partir das equações 4 e 5.

A estabilidade química da curcumina livre e incorporada nas nanopartículas foi investigada em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e 5,0 a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , através da verificação da mudança do valor da absorvância da curcumina, baseada na metodologia realizada por Luo et al. (2017). Soluções de curcumina livre e das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 em PBS, com concentração de CUR de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em intervalos de tempo determinados, a absorvância da curcumina foi determinada por espectrofotometria na região do UV-vis ( $\lambda_{\text{abs}} = 425 \text{ nm}$ ; UV-1800, Shimadzu). A absorvância em  $t = 0 \text{ h}$  foi considerada como 100%. Devido à baixa solubilidade da CUR em meio aquoso, a CUR livre foi dissolvida em PBS com DMSO 5%.

Uma ilustração esquemática das sínteses de DEX-CHO, PNIPAM-NH<sub>2</sub>, copolímero DEX-g-PNIPAM e das nanopartículas copolímero-DOX e copolímero-DOX/CUR podem ser observadas na Figura 15.

Figura 15 – Ilustração esquemática das sínteses de (I) DEX-CHO, (II) PNIPAM-NH<sub>2</sub>, (III) copolímero DEX-g-PNIPAM e das (IV) nanopartículas copolímero-DOX e copolímero-DOX/CUR



Fonte: elaborada pela autora.

## **4.8 Caracterizações**

### **4.8.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros das dextranas, derivados oxidados, PNIPAM–NH<sub>2</sub>, copolímeros e nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR foram obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) em equipamento IR Tracer 100 da Shimadzu, na faixa de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

### **4.8.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos usando espectrômetro Bruker Avance DRX300 e 500. A análise das dextranas e seus derivados oxidados foi realizada em D<sub>2</sub>O a 70 °C, dos copolímeros em D<sub>2</sub>O e DMSO-d<sub>6</sub> a 25 °C e das nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR em DMSO-d<sub>6</sub> a 25 °C. O 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato-d<sub>6</sub> de sódio (DSS) foi usado como um padrão interno para referência de deslocamento químico (0,00 ppm) em D<sub>2</sub>O. Os espectros em DMSO-d<sub>6</sub> foram ajustados a partir do sinal do solvente.

### **4.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A curcumina comercial foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (APÊNDICE A e ANEXO A) em equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de fotodiodo UV-visível SPD-M20A. Para a análise foi utilizado uma coluna C18 (250 × 4,60 mm, tamanho de partícula 5 µm) da Phenomenex. A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) na proporção de 50:50 (v/v) a 30 °C, com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL de amostra (0,5 mg mL<sup>-1</sup>). O comprimento de onda de detecção foi 425 nm.

#### 4.8.4 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A distribuição de massa molar dos polissacarídeos e dos PNIPAM-NH<sub>2</sub> foi determinada por cromatografia por exclusão de tamanho em equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A).

Para a análise das dextranas e dos seus derivados oxidados foi utilizada uma coluna PolySep Linear (300 × 7,8 mm) com pré-coluna PolySep Linear (35 × 7,8 mm). O eluente utilizado foi NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a 30 °C, fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50 µL de amostra (1,0 mg mL<sup>-1</sup>). Para calibração foram utilizados padrões de pululana P-82 (Shodex) e os valores das massas molares foram estimados utilizando a seguinte curva padrão:

$$\log M_{pk} = -1,1233V_e + 14,3364 \quad R^2 = 0,9921 \quad (7)$$

onde:  $M_{pk}$  é a massa molar de pico e  $V_e$  é o volume de eluição.

Para as amostras de PNIPAM-NH<sub>2</sub> utilizou-se coluna Phenogel 10<sup>3</sup> Å (300 × 7,8 mm), utilizando tetrahidrofurano (THF) como eluente com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50 µL. Padrões de poliestireno foram empregados para calibração e os valores das massas molares foram estimados utilizando a curva padrão a seguir:

$$\log M_{pk} = -0,4966V_e + 7,4160 \quad R^2 = 0,9970 \quad (8)$$

#### 4.8.5 Concentração de associação crítica (CAC)

A concentração de associação crítica foi determinada por espectrofluorimetria utilizando o pireno como sonda fluorescente, conforme realizado por Patrizi et al. (2009), com modificações. A partir de uma solução estoque de pireno em acetona na concentração 5 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, preparou-se uma solução de pireno em PBS 7,4 a 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com concentração 5 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. A acetona foi evaporada por fluxo de nitrogênio.

Soluções dos copolímeros nas concentrações de 2 × 10<sup>-3</sup> a 0,8 mg mL<sup>-1</sup> foram preparadas utilizando a solução de pireno 5 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Os espectros de

excitação (310 – 360 nm) das soluções, a 25 e 37 °C foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro (RF 600 SHIMADZU), aplicando um comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) de 374 nm. A razão das intensidades ( $I_{338}/I_{334}$ ) pela concentração logarítmica dos copolímeros foi usada para determinar a CAC.

#### **4.8.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

A temperatura de transição de fase (LCST) dos PNIPAM–NH<sub>2</sub> (PNIPAM<sub>30k</sub> e PNIPAM<sub>17k</sub>) e dos copolímeros (D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub>), o diâmetro médio e o índice de polidispersividade (IPD) das nanopartículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando o ZetaSizer Nano ZS da Malvern Instrument (modelo ZEN3600) com comprimento de onda do laser de 633 nm e ângulo de espalhamento de 173°.

Para a determinação da LCST, soluções dos PNIPAM–NH<sub>2</sub> e dos copolímeros (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) em PBS 7,4 a 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram aquecidas na faixa de 25 a 50 °C e as medições foram realizadas a cada aumento de 1 °C, com tempo de equilíbrio térmico de 4 minutos.

As medidas do diâmetro médio e IPD das nanopartículas foram realizadas na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, em PBS 7,4 (0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 37 °C e equilíbrio térmico de 10 min.

A sensibilidade ao pH dos copolímeros foi avaliada por DLS em PBS 7,4 e 5,0 a 0,1 mol L<sup>-1</sup>, simulando o pH do ambiente fisiológico e endossômico, respectivamente. Os copolímeros em água (1 mg mL<sup>-1</sup>; 0,5 mL) foram diluídos com PBS (0,2 mol L<sup>-1</sup>, 0,5 mL), em seguida, aquecidos a 37 °C. O tamanho das nanopartículas foi medido em intervalos de tempo determinados (10 a 720 min).

#### **4.8.7 Microscopia de força atômica (MFA)**

As imagens de microscopia de força atômica (MFA) das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>–DOX1 foram adquiridas no equipamento TT-AFM (AFM Workshop - EUA) em modo de contato intermitente, utilizando ponta de Silício (Si) (TAP300-G10, TED PELLA) com frequência de ressonância de aproximadamente 238 kHz. As soluções das nanopartículas foram colocadas em banho ultrassônico a 30 °C por 30 min, posteriormente depositadas sobre uma

superfície de mica e secas em estufa a 36 °C por 15 min. As análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr).

A morfologia das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 foi observada no equipamento MFP-3D-Bio da Asylum Research em modo de contato intermitente, utilizando ponta de Si (240AC-NA) com frequência de ressonância de aproximadamente 70 kHz. As soluções das nanopartículas foram colocadas em banho ultrassônico a 30 °C por 30 min, posteriormente depositadas sobre uma superfície de mica e secas a vácuo. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Avançada do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 4.9 Estudo de liberação *in vitro* da doxorubicina e da curcumina

Os estudos de liberação de DOX e CUR foram realizados em PBS 7,4 e 5,0 (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo lauril sulfato de sódio (LSS) a 0,1% (m/v). Resumidamente, as nanopartículas em água (1 mg mL<sup>-1</sup>) foram diluídas com PBS para concentração 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e depois transferidas para as membranas de diálise (massa molar de corte 14 000 g mol<sup>-1</sup>). As membranas de diálise foram submersas em meio de liberação com agitação constante a 75 rpm, 37 °C e no escuro. Em intervalos de tempo específicos, foram retirados 3 mL do meio de liberação e substituídos pelo mesmo volume de tampão fosfato. A quantidade de DOX e CUR liberada foi determinada por espectroscopia de fluorescência (DOX:  $\lambda_{ex}$  = 480 nm e  $\lambda_{em}$  = 590 nm; CUR:  $\lambda_{ex}$  = 425 nm e  $\lambda_{em}$  = 540 nm) utilizando curva de calibração em PBS 7,4 (APÊNDICE C) e PBS 5,0 (APÊNDICE D) contendo LSS a 0,1% (m/v). As curvas de calibração da DOX e CUR foram as seguintes:

$$I.F. = 3470,43[DOX] + 82,98 \quad R^2 = 0,9999 \quad (\text{PBS } 7,4 + \text{LSS } 0,1\%) \quad (7)$$

$$I.F. = 3692,71[DOX] + 65,78 \quad R^2 = 0,9996 \quad (\text{PBS } 5,0 + \text{LSS } 0,1\%) \quad (8)$$

$$I.F. = 3078,97[CUR] + 10,21 \quad R^2 = 0,9997 \quad (\text{PBS } 7,4 + \text{LSS } 0,1\%) \quad (9)$$

$$I.F. = 3059,16[CUR] + 39,03 \quad R^2 = 0,9991 \quad (\text{PBS } 5,0 + \text{LSS } 0,1\%) \quad (10)$$

onde: I.F. é intensidade de fluorescência, [DOX] é concentração de doxorubicina e [CUR] é concentração de curcumina.

O mecanismo de liberação da DOX e da CUR das nanopartículas foi estudado utilizando o modelo cinético proposto por Zeng et al. (2011) (Equação 11) que descreve um mecanismo de liberação baseado na interação fármaco-carreador, além do processo de difusão. A diferença de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ; Equação 12) entre os estados livre e ligado determina a quantidade de fármaco inicialmente livre ou ligado ao carreador. Os três parâmetros utilizados na caracterização do mecanismo de liberação são  $k_s$ ,  $k_{off}$  e  $\Delta G$ .

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_s t}) + \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} (1 - e^{-k_{off} t}) \quad (11)$$

$$\Delta G = -k_B T \left( \frac{k_{on}}{k_{off}} \right) \quad (12)$$

Onde:  $M_t$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ ;  $M_0$  é a quantidade inicial de fármaco;  $k_s$ ,  $k_{on}$  e  $k_{off}$  representam as constantes de velocidade para os processos de difusão, associação e dissociação, respectivamente;  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta utilizada durante os experimentos de liberação (310 K).

#### 4.10 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ ,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2, da doxorubicina livre, da curcumina livre e da mistura DOX/CUR livre em células de câncer colorretal humano (HTC-116) e linhagem não-tumoral de fibroblasto murino (L929) foi avaliada através do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; coloração amarela). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

As células da linhagem L929 ( $1 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) e HCT-116 ( $6 \times 10^4$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C e

5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Posteriormente, as amostras foram diluídas em meio de cultura, seguindo uma diluição seriada ( $r = 2$ ; Tabela 2), e incubadas por 69 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido, adicionou-se 150 µL da solução de MTT (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) e incubou-se por 3 h. Em seguida, o precipitado (Formazano; coloração púrpura) formado foi dissolvido em 150 µL de DMSO, a absorbância medida em 595 nm utilizando espectrofotômetro de placa (Molecular Devices, Spectramax 190) e a viabilidade celular (%) determinada. A concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>), que é a concentração necessária para inibir 50% das células, com respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não-linear utilizando o programa GraphPadPrism versão 8.0.

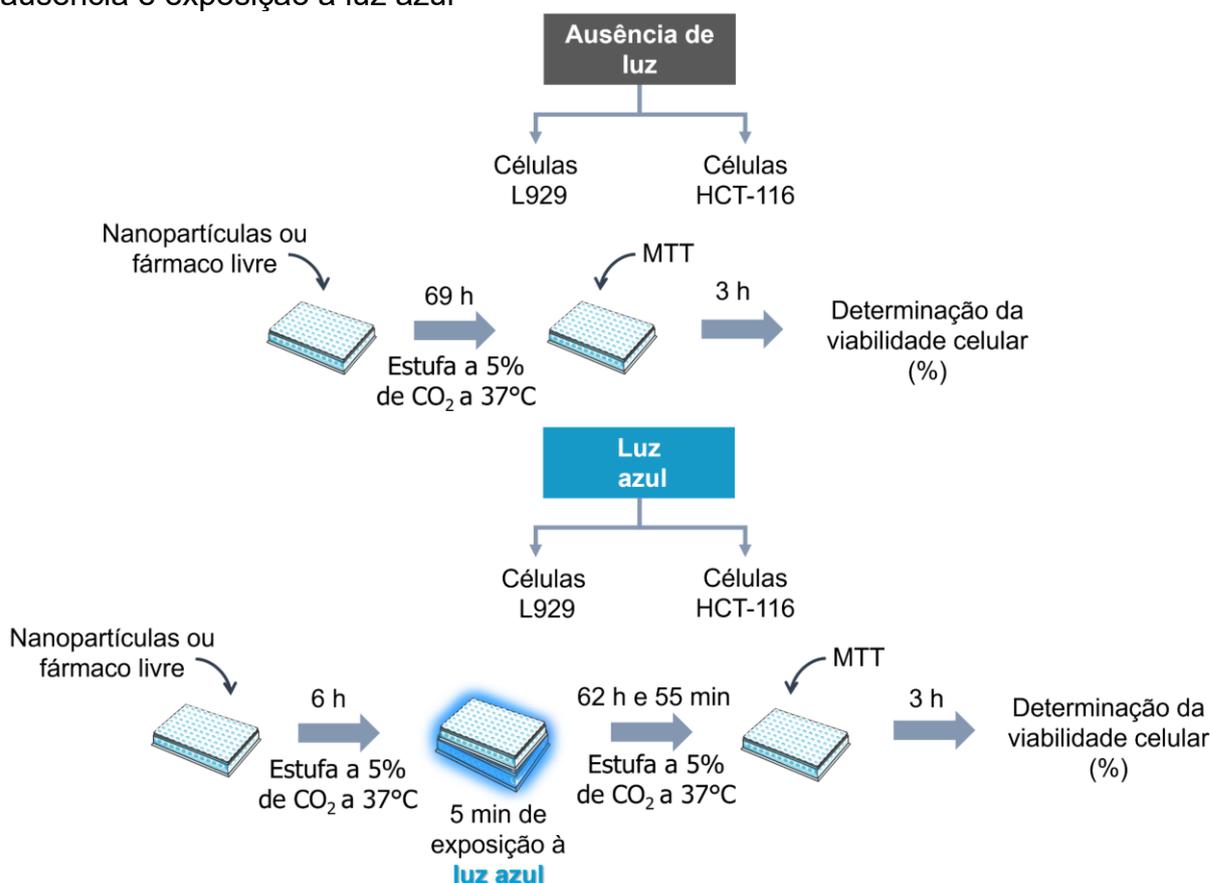
Tabela 2 – Faixa de concentração utilizada no teste de citotoxicidade para cada amostra

<b>Amostras</b>	<b>Faixa de concentração (µg mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>DOX livre</b>	5 – 0,078
<b>CUR livre</b>	10 – 0,156
<b>DOX/CUR livre</b>	5 – 0,078
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub></b>	500 – 7,8
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>–DOX1</b>	500 – 7,8
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>–DOX2</b>	100 – 1,56
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>–DOX/CUR2</b>	100 – 1,56

Fonte: dados da pesquisa.

Para avaliar o efeito de fotocitotoxicidade, após 6 h de incubação com as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>–DOX2, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>–DOX/CUR2, doxorubicina livre, curcumina livre e mistura DOX/CUR livre, as células L929 e HCT-116 foram expostas à luz azul (diodos emissores de luz com  $\lambda = 458$  nm e densidade de potência de 19 mW/cm<sup>2</sup>) por 5 min. Após a exposição à luz, as placas foram incubadas novamente para completar 69 h, em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. Após completar o período de incubação, foram realizadas as mesmas etapas do experimento sem exposição à luz (Figura 16). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Delta (LCCDelta) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr).

Figura 16 – Esquema do procedimento de determinação da viabilidade celular na ausência e exposição à luz azul



Fonte: elaborada pela autora.

#### 4.11 Ensaio de captação celular

A captação celular da DOX livre, CUR livre, mistura DOX/CUR livre e das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 foi avaliada em células HCT-116 por microscopia confocal de varredura a laser (LSM 710, Zeiss, Alemanha). As células HCT-116 foram semeadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$  cél poço<sup>-1</sup>) em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina (100 U mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 µg mL<sup>-1</sup>) sobre lamínula estéril. As células foram incubadas com os agentes terapêuticos ou as nanopartículas, na CI<sub>50</sub> a 37 °C por 24h. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído tamponado a 4% (m/v) em PBS e os núcleos celulares foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As células tratadas apenas com meio foram utilizadas como controle negativo. As imagens foram obtidas na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

#### **4.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa Statistica 10.0. Os dados foram descritos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A significância estatística dos dados avaliados foi determinada por ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Oxidação da dextrana

As dextranas de diferentes massas molares (DEX<sub>45k</sub> e DEX<sub>310k</sub>) foram oxidadas com periodato de sódio. Adicionou-se 0,79 g do reagente para obtenção de um percentual teórico de grupos aldeído de 30%. O grau de oxidação real das amostras (Tabela 3), determinado pelo método da hidroxilamina (APÊNDICE E), foi menor que o percentual de aldeídos teórico, devido à formação de estruturas hemiacetálicas (Balakrishnan et al., 2005; Gomez et al., 2007; Maia et al., 2011).

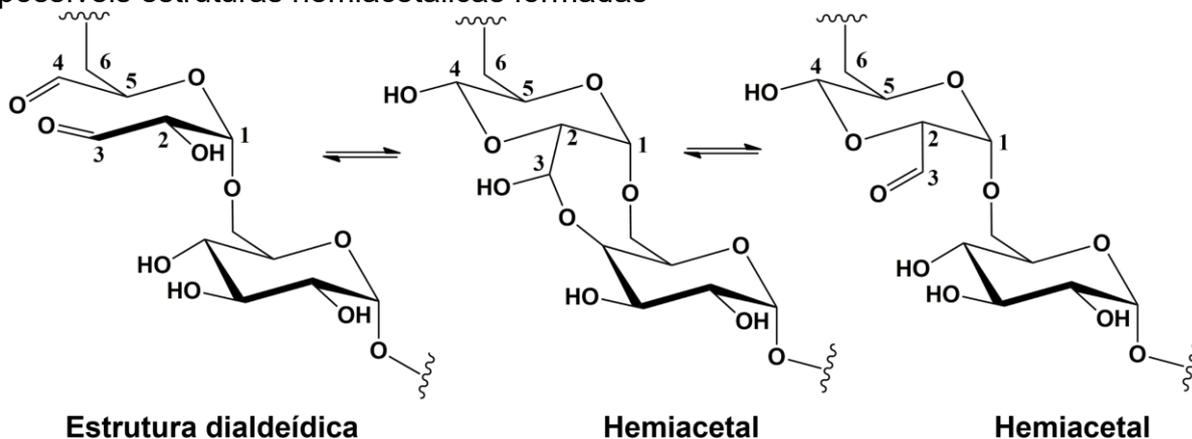
Tabela 3 – Grau de oxidação dos derivados DEX<sub>45k</sub>-CHO e DEX<sub>310k</sub>-CHO

Amostras	Grau de oxidação	
	Teórico (%)	Real (%)
DEX <sub>45k</sub> -CHO	30	24,7 ± 0,2
DEX <sub>310k</sub> -CHO		27,4 ± 0,1

Fonte: dados da pesquisa

Durante o processo de oxidação pode ocorrer a formação de estruturas hemiacetálicas a partir da reação entre os grupos aldeído das unidades oxidadas e as hidroxilas próximas de unidades não oxidadas. A formação dos hemiacetiais protege as hidroxilas impedindo a oxidação dessas unidades glicosídicas (Balakrishnan et al., 2005; Gomez et al., 2007; Maia et al., 2011). Na Figura 17, observam-se possíveis estruturas hemiacetálicas formadas a partir do derivado dialdeídico resultante da clivagem da ligação C3-C4 da unidade glicosídica da dextrana.

Figura 17 – Estrutura dialdeídica resultante da clivagem da ligação C3–C4 e possíveis estruturas hemiacetálicas formadas



Fonte: adaptado de Maia et al. (2011).

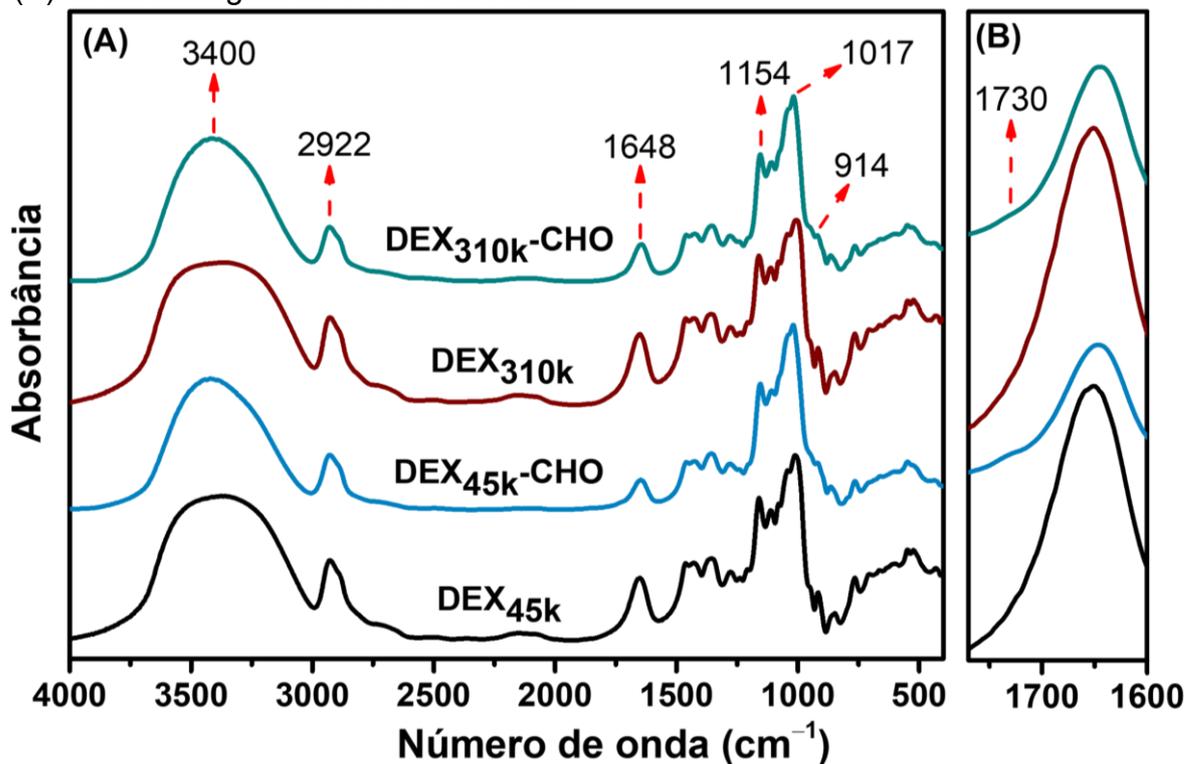
## 5.2 Caracterização das dextranas e seus derivados oxidados

### 5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As dextranas e seus derivados oxidados foram caracterizados por FTIR (Figura 18). Nos espectros das dextranas observaram-se bandas em  $3400\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento  $\text{-OH}$ ; em  $2922\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento  $\text{C-H}$ ; em  $1648\text{ cm}^{-1}$  relativo às vibrações de deformação angular  $\text{O-H}$  de água adsorvida no polissacarídeo; em  $1154\text{ cm}^{-1}$  característica do estiramento  $\text{C-O-C}$  da ligação glicosídica; em  $1017\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração de estiramento da ligação  $\text{C-O}$ , e em  $914\text{ cm}^{-1}$  atribuída à ligação  $\alpha$ -glicosídica (Purama et al., 2009; Siddiqui et al., 2014).

Nos espectros dos derivados oxidados não foi possível observar o surgimento de banda em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento  $\text{C=O}$  de aldeído. Tem sido reportado na literatura a dificuldade na observação da banda característica de  $\text{C=O}$  de aldeído em polissacarídeos oxidados com grau de oxidação  $<50\%$  (Lisman et al., 2014; Roy et al., 2023).

Figura 18 – (A) Espectros de FTIR das dextranas e seus derivados oxidados e (B) zoom da região de 1770 a 1600  $\text{cm}^{-1}$



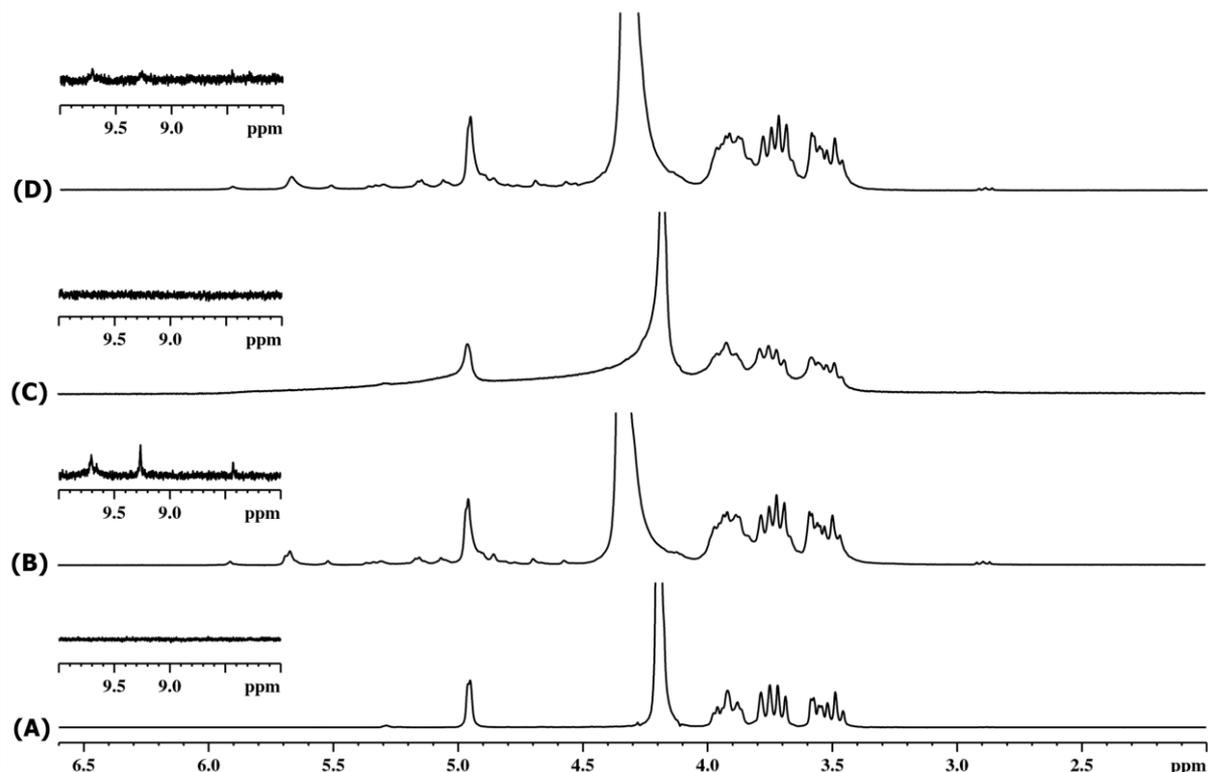
Fonte: dados da pesquisa.

### 5.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

A estrutura química da dextrana e seus derivados também foi verificada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das dextranas, na Figura 19 (A e B), mostraram um sinal em  $\delta = 4,95$  ppm atribuído ao próton anomérico da unidade glicosídica unida pela ligação  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 e um sinal fraco em  $\delta = 5,29$  ppm relativo ao próton anomérico da unidade glicosídica unida pela ligação  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3. Os sinais de  $\delta = 3,4$  a  $4,0$  ppm correspondem aos prótons dos carbonos C2, C3, C4, C5 e C6 dos anéis glicosídicos (Maia et al., 2005).

Nos espectros dos derivados oxidados, Figura 19 (C e D), foram observados novos sinais de intensidade fraca entre  $\delta = 8,40$  e  $9,80$  ppm referentes aos prótons de aldeído, confirmando a modificação química. A baixa intensidade dos sinais pode ser devido à formação de hemiacetais, que pode ser confirmada pelo surgimento dos sinais entre  $\delta = 4,50$  e  $6,00$  ppm, atribuídos aos prótons presentes em suas estruturas (Maia et al., 2005; Meena et al., 2018).

Figura 19 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  das dextranas (A) DEX<sub>45k</sub>, (C) DEX<sub>310k</sub> e seus derivados oxidados (B) DEX<sub>45k</sub>-CHO, (D) DEX<sub>310k</sub>-CHO em D<sub>2</sub>O a 70 °C



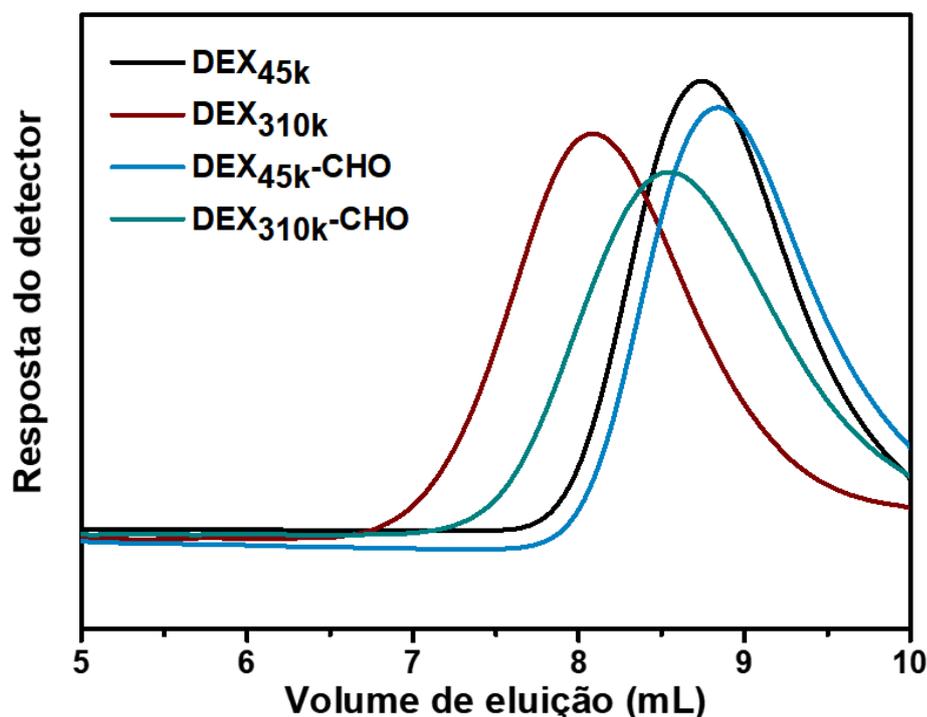
Fonte: dados da pesquisa.

### 5.2.3 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A distribuição de massa molar das dextranas e de seus derivados oxidados foi determinada por SEC e os cromatogramas estão apresentados na Figura 20. Na Tabela 4, estão mostrados os valores de massa molar de pico ( $M_{pk}$ ), massa molar ponderal média ( $M_w$ ), massa molar numérica média ( $M_n$ ) e dispersão ( $\mathcal{D}$ ).

A reação de oxidação resultou em derivados com massas molares menores que o material de partida. Maia et al. (2005 e 2011), que também realizaram a oxidação de dextrana, obtiveram derivados com massas molares menores que a dextrana e atribuíram esse comportamento à ocorrência de degradação da cadeia polimérica no processo reacional. Balakrishnan et al. (2005) e Gomez et al. (2007) observaram uma grande redução na massa molar do alginato com o aumento do grau de oxidação, indicando que a degradação é diretamente proporcional à quantidade de periodato de sódio no meio reacional.

Figura 20 – Cromatogramas das dextranas e seus derivados oxidados



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 4 – Dados de massas molares das dextranas e seus derivados oxidados determinadas por SEC

Amostras	$M_{pk}$	$M_w$		$\bar{D}$
		$/(10^4 \text{ g mol}^{-1})$		
		$M_w$	$M_n$	$(M_w/ M_n)$
DEX <sub>45k</sub>	3,3	4,5	1,2	3,8
DEX <sub>45k</sub> -CHO	2,5	3,1	1,0	3,1
DEX <sub>310k</sub>	18,0	31,0	4,1	7,6
DEX <sub>310k</sub> -CHO	5,5	10,0	1,6	6,3

Fonte: dados da pesquisa.

O efeito da degradação da cadeia polimérica foi maior na dextrana de partida com elevada massa molar (DEX<sub>310k</sub>;  $M_w = 31,0 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ). O derivado oxidado DEX<sub>310k</sub>-CHO ( $M_w = 10,0 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ) apresentou  $M_w$  68% menor que a DEX<sub>310k</sub>, enquanto o DEX<sub>45k</sub>-CHO ( $M_w = 3,1 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ) apresentou  $M_w$  31% que a DEX<sub>45k</sub>. Isto indica que cadeias poliméricas longas podem ser mais susceptíveis à clivagem da cadeia polimérica no processo de oxidação. Comportamento similar foi observado para dextranas com massas molares de  $20,4 \times 10^4$  (Dex) e  $7,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  (Dex60). Após a reação de oxidação os derivados oxidados apresentaram massas molares 45 e 19% menores que as

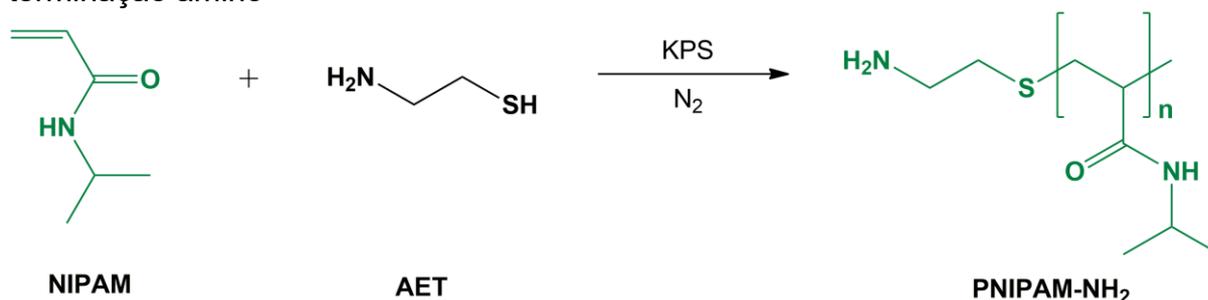
dextranas de partida Dex e Dex60, respectivamente (Flynn et al., 2023).

A modificação química também levou à diminuição dos valores de dispersão indicando a obtenção de cadeias com tamanhos mais homogêneos (Gomez et al., 2007; Flynn et al., 2023).

### 5.3 Síntese do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino

A síntese dos PNIPAM-NH<sub>2</sub> de diferentes massas molares (PNIPAM<sub>17k</sub> e PNIPAM<sub>30k</sub>) foi realizada por polimerização radicalar dos monômeros de N-isopropilacrilamida (NIPAM) utilizando o persulfato de potássio (KPS) como iniciador e o cloridrato de 2-aminoetanotiol (AET·HCl) como agente de transferência de cadeia (Figura 21).

Figura 21 – Esquema reacional da síntese do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino



Fonte: elaborada pela autora.

O AET tem sido empregado como eficiente agente de transferência de cadeias devido à fraca ligação S-H e à alta reatividade do radical tiil (S<sup>•</sup>) (Henríquez et al., 2003; Marques et al., 2016; Lima et al., 2021). A polimerização utilizando agentes de transferência de cadeias permite a obtenção de polímeros com grupos terminais definidos. O AET foi utilizado a fim de fornecer ao polímero a terminação amino que possibilita a reação com os grupos aldeído presentes na dextrana oxidada.

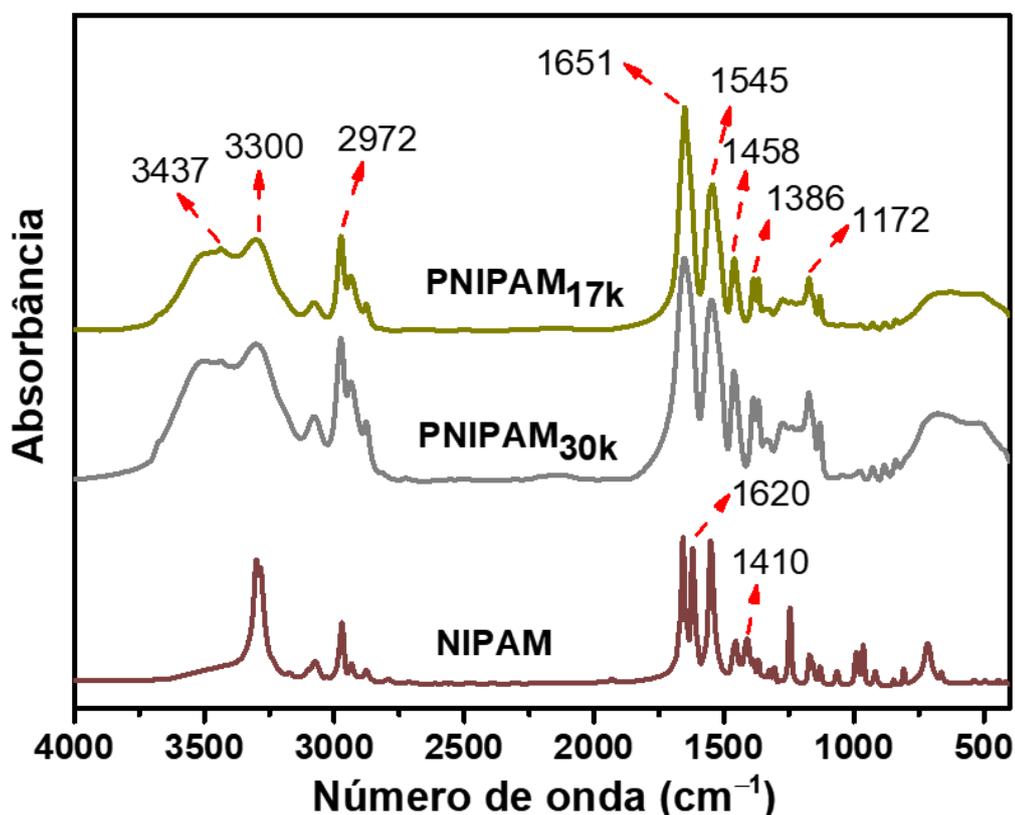
A quantidade de grupos amino nos PNIPAM-NH<sub>2</sub> foi determinada por titulação potenciométrica. Para o PNIPAM<sub>17k</sub> ( $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$ ) a quantidade de grupos amino por massa de material foi maior que para o PNIPAM<sub>30k</sub> ( $7,3 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ ), o que já era esperado visto que foi adicionado uma maior quantidade de AET na síntese do PNIPAM<sub>17k</sub>.

## 5.4 Caracterização do poli(N-isopropilacrilamida) com terminação amino

### 5.4.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 22, estão mostrados os espectros dos poli(N-isopropilacrilamida) amino terminados e do monômero NIPAM. As bandas em 3437 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento N-H de amida, 2972  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada à vibração de estiramento C-H do grupo isopropil, 1651  $\text{cm}^{-1}$  atribui-se ao estiramento C=O de amida, 1545  $\text{cm}^{-1}$  à vibração de deformação angular de N-H do grupo amida, 1458 e 1386  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às deformações de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, e a banda em 1172  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C-N dos grupos amida (Jijo et al., 2010). A ausência de bandas em 1620 e 1410  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes à vibração de estiramentos C=C e deformação angular =C-H de alcenos, indicam a polimerização do monômero (Lü et al., 2011).

Figura 22 – Espectros de FTIR dos PNIPAM<sub>17k</sub>, PNIPAM<sub>30k</sub> e do monômero NIPAM

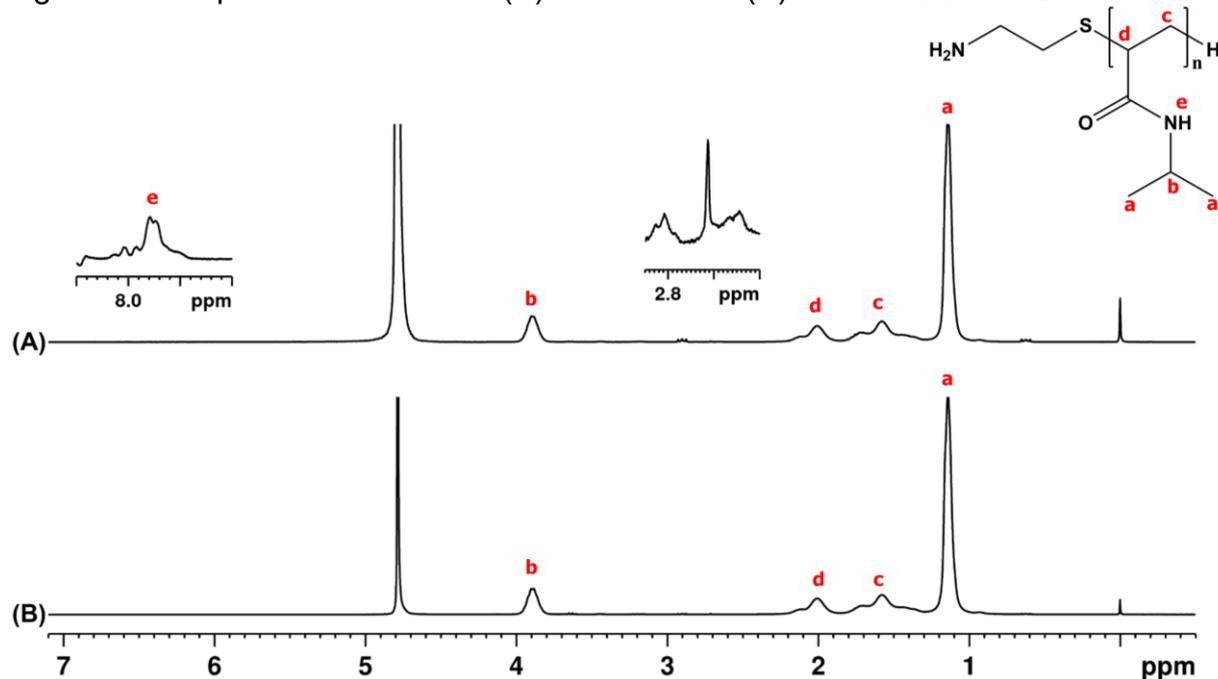


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A estrutura química dos PNIPAM-NH<sub>2</sub> foi verificada por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H (Figura 23) foram observados sinais em  $\delta = 1,14$  (**a**) e 3,90 ppm (**b**), atribuídos aos prótons metílicos (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) e metínico (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) do grupo isopropil, respectivamente. Os sinais em  $\delta = 1,58$  (**c**) e 2,01 ppm (**d**) são referentes aos prótons metilênicos (-CH-CH<sub>2</sub>) e metínico (-CH-CH<sub>2</sub>) da cadeia regular do polímero, respectivamente. O sinal em  $\delta = 7,8$  ppm (**e**) corresponde ao próton do grupo amida (LEAL et al., 2013). Além disso, os sinais entre  $\delta = 2,60$  e 2,85 ppm foram atribuídos aos prótons metilênicos (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) do agente de transferência de cadeia 2-aminoetanotiol (AET) (Leal et al., 2013).

Figura 23 – Espectros de RMN <sup>1</sup>H (A) PNIPAM<sub>17k</sub> e (B) PNIPAM<sub>30k</sub> em D<sub>2</sub>O a 25 °C

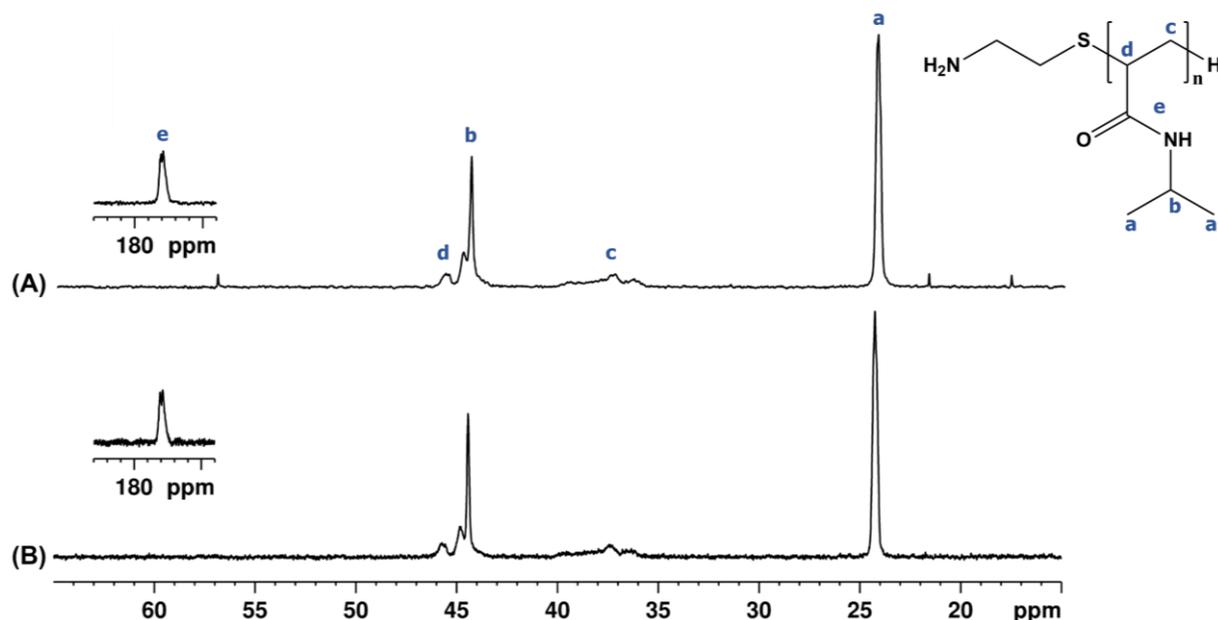


Fonte: dados da pesquisa.

Nos espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figura 24) observaram-se sinais em  $\delta = 24,25$  (**a**) e 44,44 ppm (**b**), atribuídos aos carbonos metílicos (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) e metínico (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) do grupo isopropil. Os sinais em  $\delta = 37,32$  (**c**) e 45,71 ppm (**d**) correspondem aos carbonos metilênicos (-CH-CH<sub>2</sub>) e metínico (-CH-CH<sub>2</sub>) da cadeia regular do polímero. O sinal em  $\delta = 178$  ppm (**e**) é atribuído ao carbono carbonílico do grupo amida (ISE et al., 2011). Sinais referentes aos carbonos do grupo terminal não foram observados nos espectros de RMN <sup>13</sup>C, possivelmente devido à baixa

quantidade presente no material.

Figura 24 – Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (A) PNIPAM $_{17\text{k}}$  e (B) PNIPAM $_{30\text{k}}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$



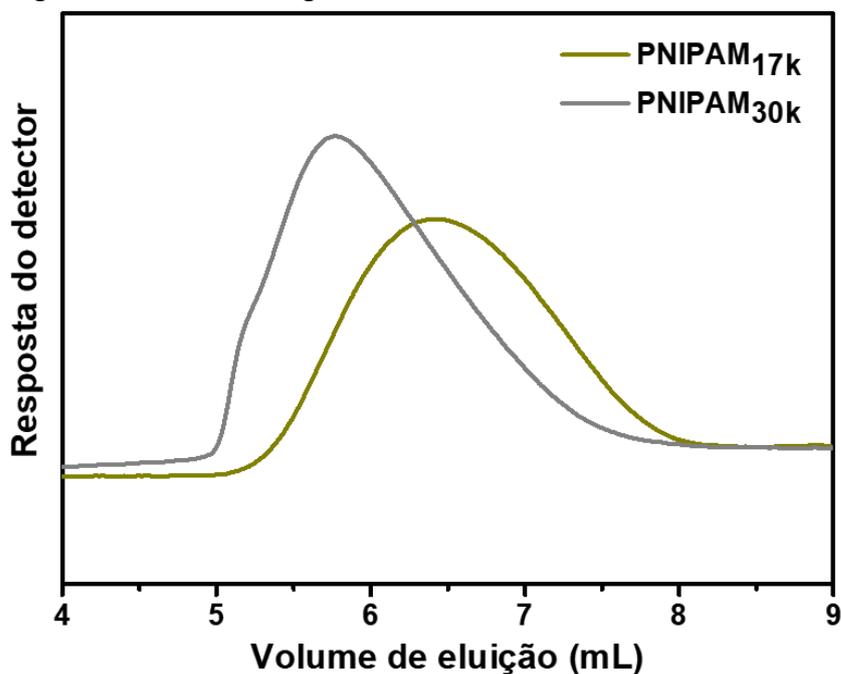
Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.4.3 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A distribuição de massa molar dos PNIPAM-NH<sub>2</sub> sintetizados foi determinada por SEC e os cromatogramas estão apresentados na Figura 25. Na Tabela 5, estão mostradas as razões molares AET/NIPAM e os valores de  $M_{pk}$ ,  $M_w$ ,  $M_n$  e  $\bar{D}$ . Pode-se observar que a quantidade de AET adicionado é inversamente proporcional à massa molar dos PNIPAM-NH<sub>2</sub>.

O agente de transferência de cadeia tem a função de controlar o comprimento das cadeias, com isso o aumento de AET no meio, ou seja, maior quantidade de sítios para crescimento de cadeias, impede que o polímero cresça muito durante a reação e proporciona a obtenção de homopolímeros com massas molares menores (Leal et al., 2013; Lencina et al., 2014).

Os valores de  $M_w$ ,  $M_n$  e  $\bar{D}$  do PNIPAM $_{17\text{k}}$  foram próximos aos obtidos por Gupta et al. (2011) que também sintetizaram PNIPAM-NH<sub>2</sub> ( $M_w = 1,90 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $M_n = 1,12 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  e  $\bar{D} = 1,69$ ) utilizando o mesmo procedimento e razão molar AET/NIPAM de 0,02.

Figura 25 – Cromatogramas dos PNIPAM-NH<sub>2</sub> sintetizados

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 5 – Valores das razões molares AET/NIPAM,  $M_{pk}$ ,  $M_w$ ,  $M_n$  e  $\bar{D}$  para os PNIPAM-NH<sub>2</sub> sintetizados

Amostras	AET/NIPAM	$M_{pk}$	$M_w$		$\bar{D}$
			$M_n$	$\bar{D}$	
		/(10 <sup>4</sup> g mol <sup>-1</sup> )			( $M_w/M_n$ )
PNIPAM <sub>30k</sub>	0,01	3,6	3,0	1,9	1,6
PNIPAM <sub>17k</sub>	0,02	1,7	1,7	1,0	1,7

Fonte: Dados da pesquisa.

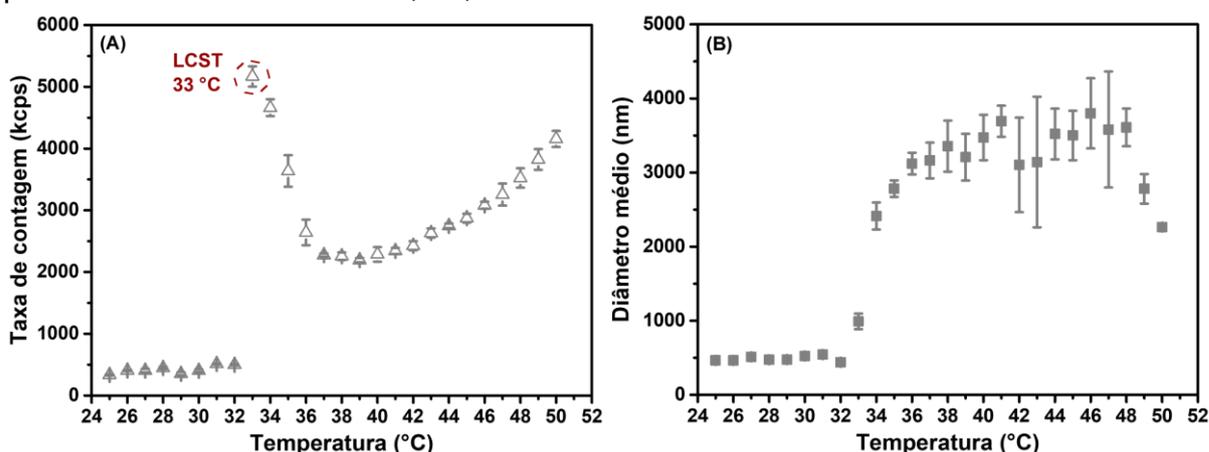
#### 5.4.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Soluções de PNIPAM-NH<sub>2</sub> (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) em PBS 7,4 foram analisadas por DLS e a variação da taxa de contagem (intensidade de luz espalhada) com o aumento da temperatura foi avaliada, como mostrado nas Figuras 26A e 27A.

A temperatura de transição de fase (LCST) foi determinada pelo início do aumento da taxa de contagem. Para o PNIPAM<sub>30k</sub> e PNIPAM<sub>17k</sub> observa-se um brusco aumento na taxa de contagem em 33 e 35 °C, respectivamente, indicativo que as cadeias de PNIPAM-NH<sub>2</sub> foram desidratadas e a interação entre as cadeias passou a prevalecer. A taxa de contagem é uma medida da intensidade de luz espalhada e seu crescimento está associado ao aumento da quantidade de partículas no meio (Huang et al., 2017). Para ambos os polímeros foi observada uma

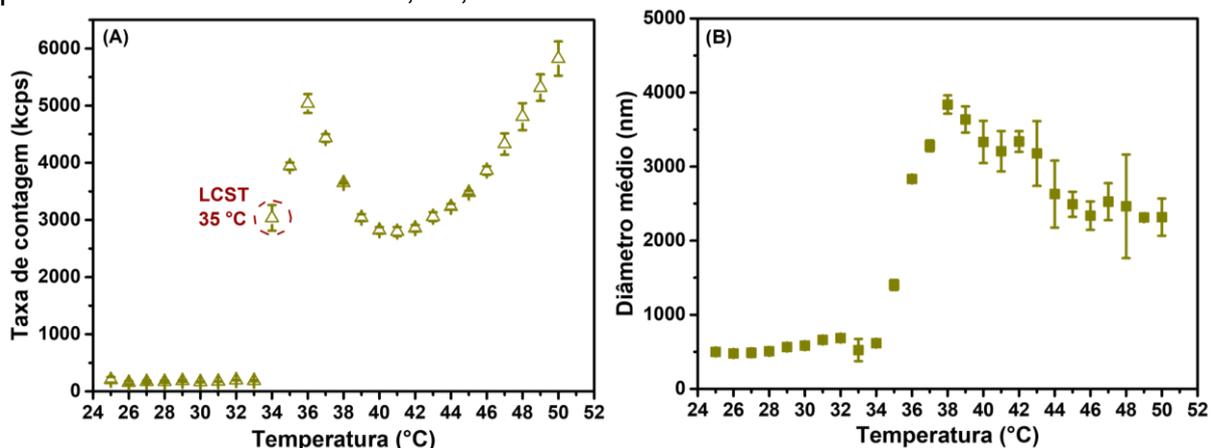
redução da taxa de contagem em temperaturas acima da LCST seguida de novo aumento o que sugere a precipitação de parte dos agregados formados (Kurzahls et al., 2017).

Figura 26 – (A) Taxa de contagem e (B) diâmetro médio em função da temperatura para o PNIPAM<sub>30k</sub> em PBS 7,4 0,1 mol L<sup>-1</sup>



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 27 – (A) Taxa de contagem e (B) diâmetro médio em função da temperatura para o PNIPAM<sub>17k</sub> em PBS 7,4 0,1 mol L<sup>-1</sup>



Fonte: dados da pesquisa.

Os PNIPAM-NH<sub>2</sub> apresentaram valores distintos de LCST por possuírem massas molares diferentes. O valor da temperatura de transição de fase pode ser influenciado por uma série de fatores como concentração, massa molar, presença de sais e copolimerização com outros polímeros (Khimani et al., 2019). Com o aumento do comprimento da cadeia polimérica, as interações intercadeias tornam-se mais intensas ocorrendo um ganho entrópico, o que proporciona uma redução na LCST (Pamies et al., 2009; Pasparakis; Tsitsilianis, 2020).

A variação do tamanho de partículas com o aumento da temperatura

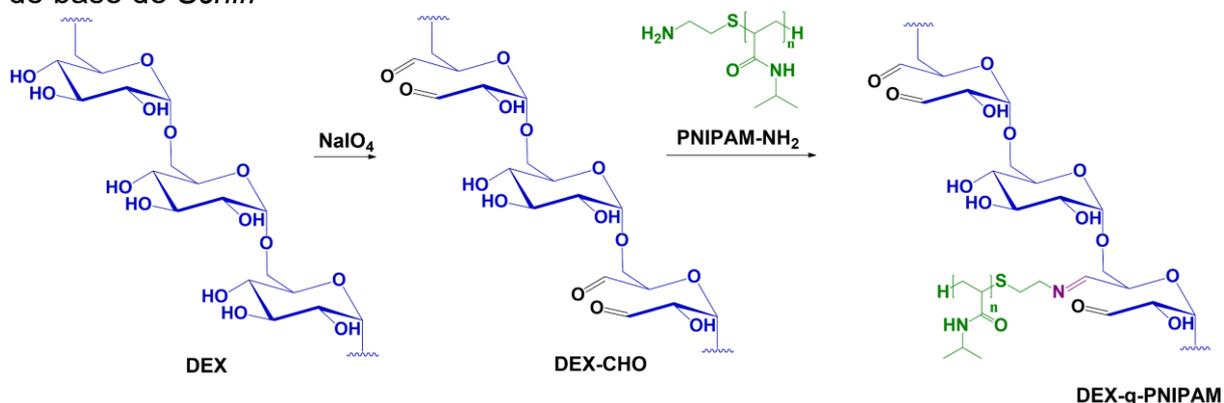
também foi avaliada e a partir da temperatura de transição observou-se um aumento do tamanho das partículas (Figuras 26B e 27B). As cadeias de PNIPAM-NH<sub>2</sub> tornaram-se mais hidrofóbicas e tenderam a formar agregados com tamanhos maiores que 2000 nm.

### 5.5 Síntese dos copolímeros dextrana-g-poli(N-isopropilacrilamida)

Os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> foram sintetizados via reação de formação de base de *Schiff* entre os grupos amino terminais dos PNIPAM-NH<sub>2</sub> e os grupos aldeído das dextranas oxidadas a fim de se obter materiais com características termo- e pH-responsivas, bem como com capacidade de auto-organização em nanopartículas (Figura 28).

Na abordagem de enxertia “*grafting to*” cadeias poliméricas com grupos terminais reativos são acopladas à cadeia principal (como polissacarídeos). Uma vantagem deste método é o controle do tamanho tanto da cadeia principal quanto das cadeias laterais, sendo possível caracterizá-las antes da reação de enxertia. Porém, uma das suas limitações é a baixa densidade de enxerto devido ao impedimento estérico entre as cadeias laterais, que dificulta a reação de novas cadeias com os sítios ativos da cadeia principal (Atanase et al., 2017).

Figura 28 – Esquema reacional da síntese dos copolímeros via reação de formação de base de *Schiff*



Fonte: elaborada pela autora.

Os valores de rendimento das sínteses dos copolímeros foram estatisticamente iguais, como observado na Tabela 6. Os rendimentos foram próximos aos alcançados por Lima et al. (2021) que enxertaram PNIPAM-NH<sub>2</sub> de diferentes massas molares em galactomanana de *Delonix regia* via reação de

formação de base de *Schiff* (49 – 52%) e utilizaram as mesmas condições de síntese. Reações de enxertia através da estratégia “*grafting to*” geralmente apresentam baixos rendimentos devido ao impedimento estérico entre as cadeias laterais que impede a inserção de novas cadeias (Atanase et al., 2017; Lima et al., 2021).

Tabela 6 – Valores dos rendimentos reacionais dos copolímeros sintetizados

Copolímeros	Rendimento (%)
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub>	47 ± 1
D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub>	47 ± 2
D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub>	49 ± 1

Fonte: dados da pesquisa.

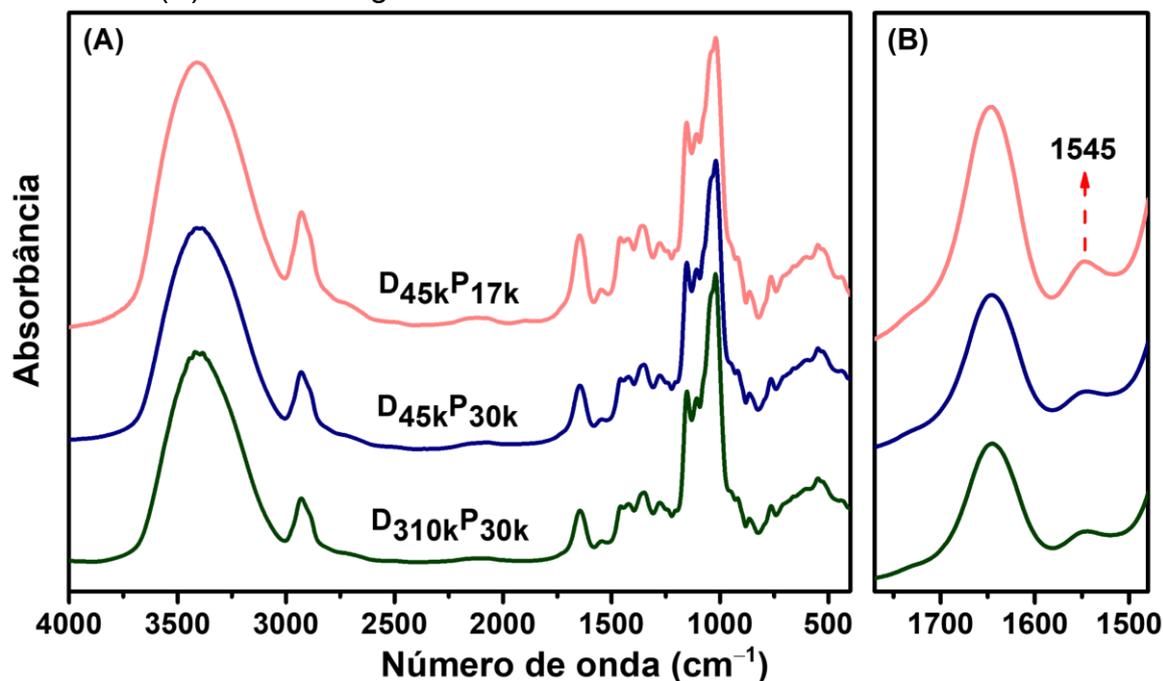
## 5.6 Caracterização dos copolímeros

### 5.6.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 29, estão apresentados os espectros dos copolímeros por enxertia D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>17k</sub>P<sub>30k</sub>. Foram observadas bandas características da dextrana oxidada e do poli(N-isopropilacrilamida), indicando a ocorrência da reação de enxertia. Foram observadas bandas em 3400 cm<sup>-1</sup>, atribuída ao estiramento O-H e em 1154 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento C-O-C da ligação glicosídica. E a banda em 1545 cm<sup>-1</sup>, atribuída à vibração de deformação angular da ligação N-H de amida oriunda do PNIPAM-NH<sub>2</sub>.

As bandas correspondentes ao estiramento C=O de amida (1650 cm<sup>-1</sup>) do PNIPAM e ao estiramento C=N (1690-1590 cm<sup>-1</sup>) das ligações iminas formadas entre as DEX-CHO e os PNIPAM-NH<sub>2</sub> foram possivelmente sobrepostas à banda de estiramento O-H de água adsorvida no polissacarídeo. Su et al. (2016) prepararam microgéis via reação de formação de base de *Schiff* entre dextrana oxidada e etilenodiamina e nos espectros de FTIR a banda referente ao  $\nu$  (C=N) das ligações iminas ficaram sobrepostas à banda de  $\nu$  (O-H) de água adsorvida no polissacarídeo.

Figura 29 – (A) Espectros de FTIR dos copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>17k</sub>P<sub>30k</sub> e (B) zoom da região de 1770 a 1480 cm<sup>-1</sup>



Fonte: dados da pesquisa.

Na Tabela 8, estão mostradas as razões entre a absorvância das bandas em 1545 cm<sup>-1</sup>, correspondente ao PNIPAM-NH<sub>2</sub>, e 1154 cm<sup>-1</sup> da ligação glicosídica da dextrana oxidada. A variação na massa molar da dextrana oxidada não influenciou na enxertia. Enquanto a redução do tamanho da cadeia de PNIPAM-NH<sub>2</sub> proporcionou maior grau de enxertia devido ao menor impedimento estérico.

Tabela 7 – Razão entre as áreas das bandas 1545 e 1154 cm<sup>-1</sup> ( $A_{1545}/A_{1154}$ ) para os copolímeros sintetizados

Copolímeros	$A_{1545}/A_{1154}$
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub>	0,0035
D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub>	0,0036
D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub>	0,0081

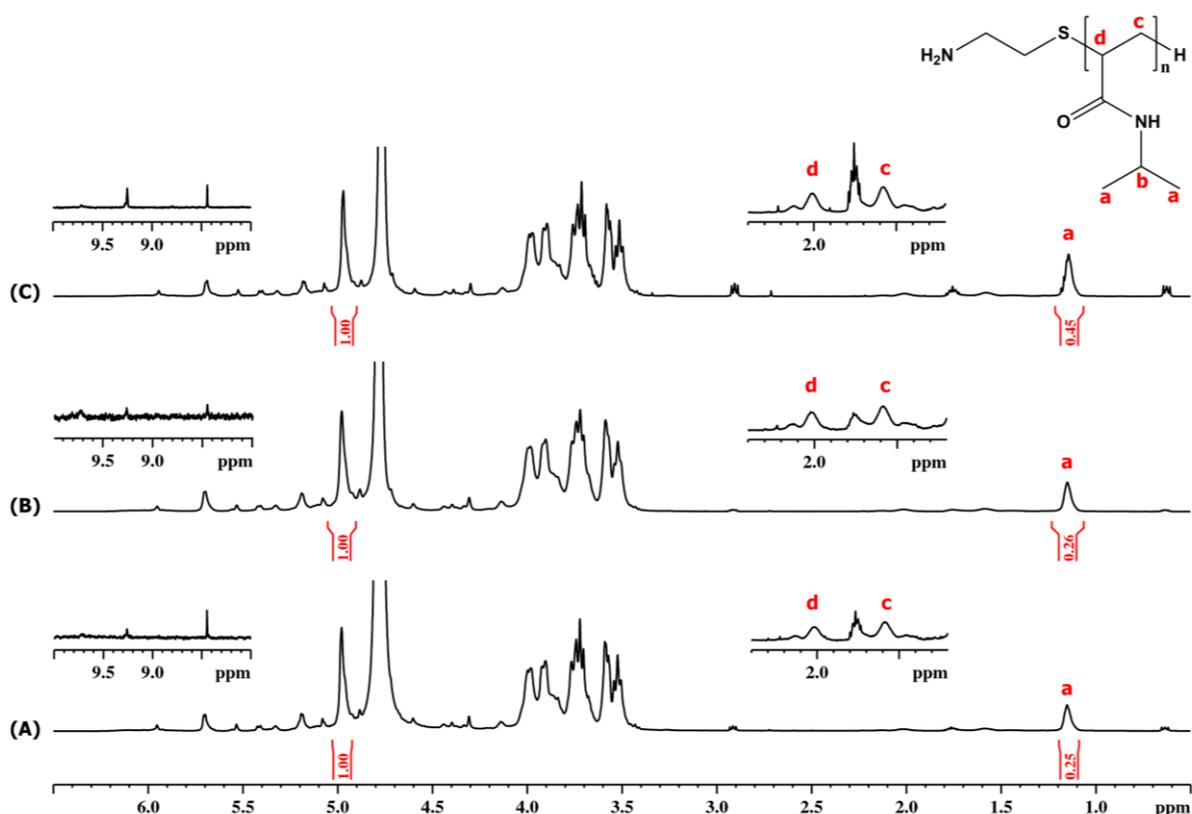
Fonte: dados da pesquisa.

Lima et al. (2021) também observaram a mesma tendência de aumento do grau de enxertia ao utilizarem PNIPAM-NH<sub>2</sub> de baixa massa molar na síntese de copolímeros à base de galactomanana via reação de formação de base de *Schiff*, justificada pelo menor impedimento estérico.

### 5.6.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

A presença de dextrana oxidada e poli(N-isopropilacrilamida) nos copolímeros sintetizados também foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30). Foram observados sinais atribuídos aos prótons dos carbonos C2, C3, C4, C5 e C6 dos anéis glicosídicos da dextrana oxidada ( $\delta = 3,4 - 4,0$  ppm), bem como o referente ao próton anomérico ( $\delta 4,97$  ppm). Além disso, três sinais correspondentes ao PNIPAM ( $\delta = 1,14$  (-CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,58 (-CH-CH<sub>2</sub>) e 2,01 ppm (-CH-CH<sub>2</sub>)) também foram detectados nos espectros dos copolímeros. O sinal atribuído ao próton metínico do grupo isopropil do PNIPAM ( $\delta = 3,90$  ppm) encontra-se sobreposto aos sinais da dextrana oxidada. Nos espectros ainda foram observados sinais de próton de aldeído, o que torna possível a conjugação dos copolímeros com fármacos que possuem grupo amino na estrutura, como a doxorrubicina.

Figura 30 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos copolímeros (A) D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, (B) D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e (C) D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> em D<sub>2</sub>O a 25 °C



Fonte: dados da pesquisa.

A substituição molar (SM), ou seja, a quantidade de NIPAM por unidade glicosídica (UG), foi determinada a partir da razão das áreas dos sinais

correspondentes aos prótons metílicos do grupo isopropil (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) do PNIPAM em  $\delta = 1,14$  ppm (P) e o sinal relativo ao próton anomérico da ligação  $\alpha$ -1,6 em  $\delta = 4,95$  ppm (A) (Equação 13).

$$SM = \frac{NIPAM}{UG} = \frac{P/6}{A} \quad (13)$$

O copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> apresentou uma maior quantidade de NIPAM e os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> mostraram valores de SM próximos (Tabela 9). Esta mesma tendência foi observada por FTIR. A enxertia não foi influenciada pela variação da massa molar da dextrana oxidada, enquanto a redução do tamanho da cadeia do PNIPAM-NH<sub>2</sub> proporcionou uma maior enxertia justificada pelo menor impedimento estérico.

Tabela 8 – Valores de substituição molar (SM) para os copolímeros sintetizados

Copolímeros	SM
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub>	0,042
D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub>	0,043
D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub>	0,075

Fonte: dados da pesquisa.

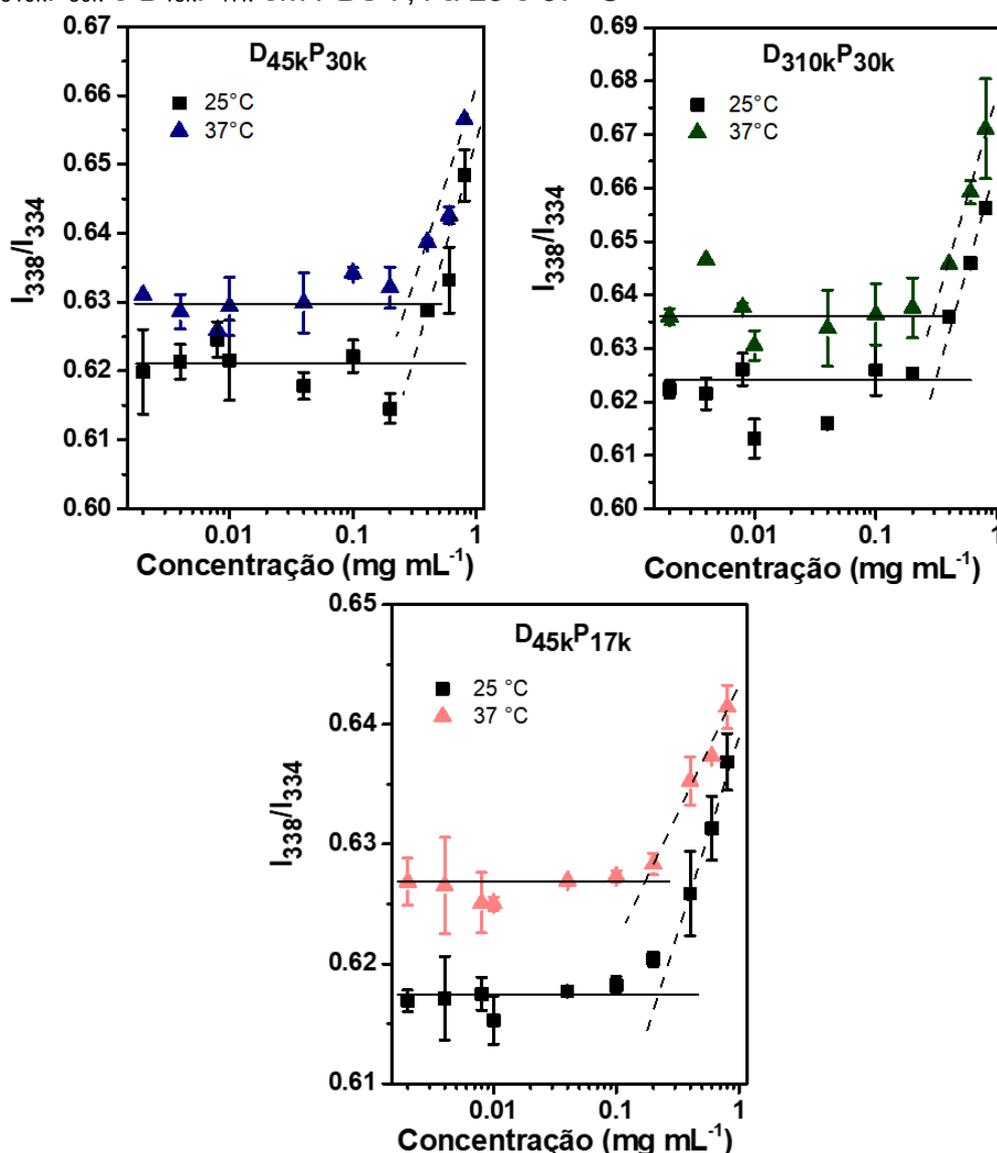
### 5.6.3 Concentração de associação crítica (CAC)

A concentração de associação crítica (CAC), ou seja, a concentração mínima de copolímeros necessária para a formação das nanopartículas, foi determinada por espectroscopia de fluorescência usando pireno como sonda, que apresenta sensibilidade à polaridade do ambiente circundante (Kalyanasundaram; Thomas, 1977). A razão das intensidades ( $I_{338}/I_{334}$ ) do espectro de excitação do pireno foi medida em uma série de concentrações dos copolímeros a 25 e 37 °C e utilizada para caracterizar a polaridade do ambiente em que o pireno se encontrava (Figura 31).

Em baixas concentrações, os valores de  $I_{338}/I_{334}$  eram baixos, indicando que o pireno estava disperso no meio aquoso. No entanto, após atingir uma determinada concentração, a razão  $I_{338}/I_{334}$  aumentou, sugerindo que o pireno se

encontrava em meio apolar, referente aos domínios hidrofóbicos formados pela associação dos copolímeros. Tanto a 25 °C quanto a 37 °C observou-se um aumento na razão  $I_{338}/I_{334}$ , sugerindo a formação de aglomerados a 25 °C. A formação de aglomerados com o aumento da concentração de copolímero, mesmo em temperaturas abaixo da temperatura de transição, é atribuída a associação intercadeias (Kjønixsen et al., 2003). Este comportamento também foi observado por Tan et al. (2011) para dextrana-*g*-PNIPAM, por Constantin et al. (2017) para pululana-*g*-PNIPAM, por Abreu et al. (2016) para goma do cajueiro-*g*-PNIPAM e por Gomes et al., (2020) e Lima et al. (2021) para galactomanana-*g*-PNIPAM.

Figura 31 – Razão das intensidades ( $I_{338}/I_{334}$ ) do espectro de excitação do pireno em função da concentração dos copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> em PBS 7,4 a 25 e 37 °C



Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de CAC foram determinados pela interseção entre as linhas mostradas na Figura 31 e estão reportados na Tabela 9. Os três copolímeros apresentaram capacidade de auto-organização em nanopartículas em concentrações abaixo de  $0,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> mostraram valores de CAC próximos, indicando que ambos têm balanço hidrofílico/hidrofóbico semelhante. Os menores valores de CAC para o copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> deve-se a maior quantidade de PNIPAM, que favorece a formação dos domínios hidrofóbicos em concentrações menores (Constantin et al., 2017).

Tabela 9 – Valores de CAC para os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> em PBS 7,4 a 25 e 37 °C

Copolímeros	CAC (mg mL <sup>-1</sup> )	
	25 °C	37 °C
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub>	0,30	0,27
D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub>	0,31	0,29
D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub>	0,22	0,17

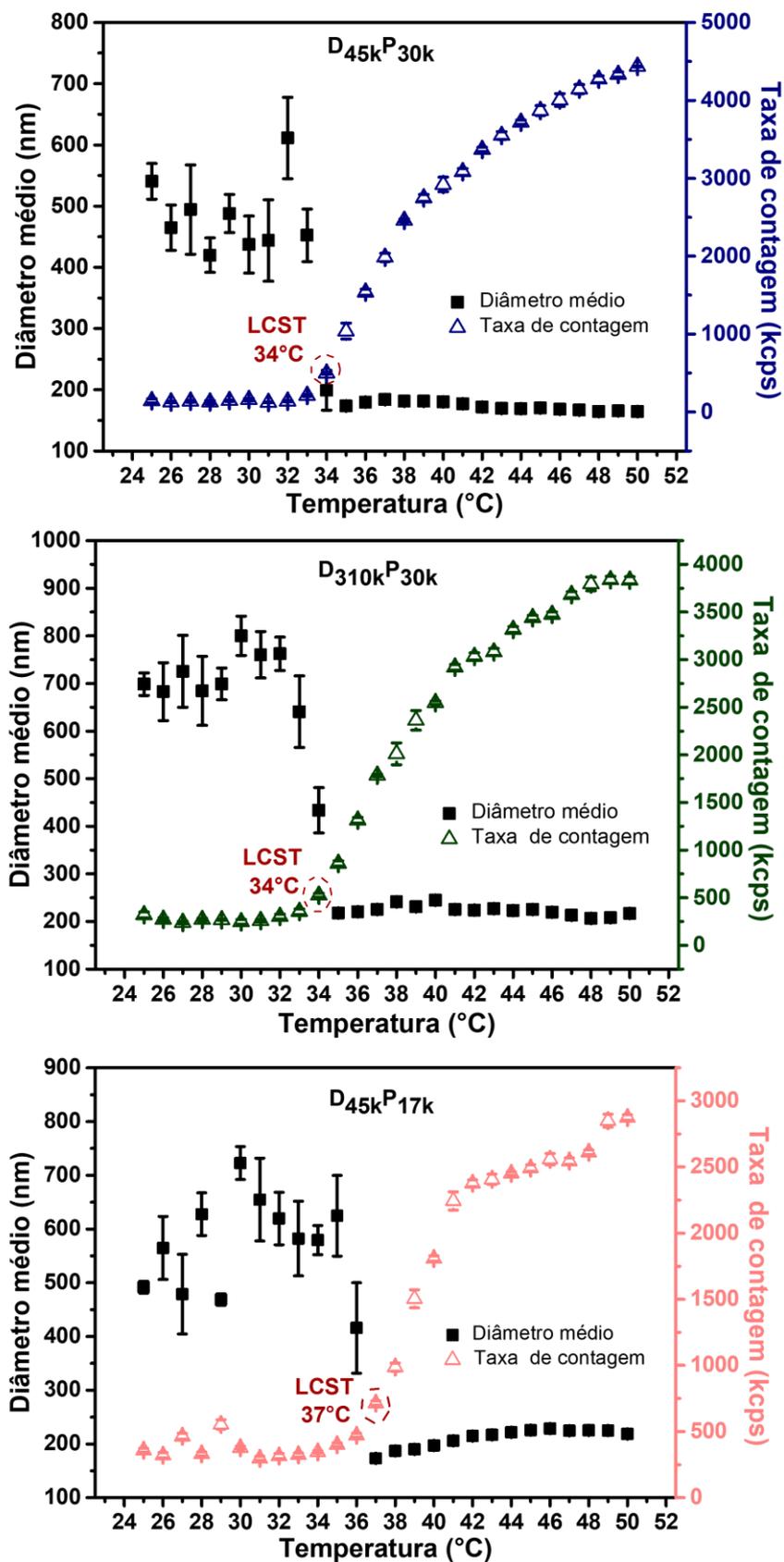
Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de CAC (Tabela 9) para os copolímeros sintetizados foram inferiores aos encontrados por Tan et al. (2011), que também enxertaram dextrana com PNIPAM ( $2,870 \text{ mg mL}^{-1}$  a 25 °C e  $0,762 \text{ mg mL}^{-1}$  a 37 °C), utilizando polimerização via radicais livres. No entanto, foram maiores que os determinados por Blanco-Fernandez et al. (2017) para copolímeros de dextrana-*g*-PNIPAM ( $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$  a 37 °C) sintetizados via ATRP e por Lima et al. (2021) para copolímeros de galactomanana-*g*-PNIPAM ( $0,056 \text{ mg mL}^{-1}$  a 25 °C e  $0,039 \text{ mg mL}^{-1}$  a 50 °C) obtidos via reação de formação de base de *Schiff*. O grau de enxertia de PNIPAM é um fator que influencia na associação dos copolímeros o que pode ter levado a essas diferenças nos valores de CAC dos copolímeros comparados.

#### 5.6.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A mudança na taxa de contagem em função da temperatura foi utilizada para determinar a temperatura de transição de fase dos copolímeros, como pode ser visto nos gráficos mostrados na Figura 32.

Figura 32 – Variação da taxa de contagem e diâmetro médio em função da temperatura para os copolímeros  $D_{45k}P_{30k}$ ,  $D_{310k}P_{30k}$  e  $D_{45k}P_{17k}$  em PBS 7,4



Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de LCST para todos os copolímeros foram maiores que o do PNIPAM-NH<sub>2</sub> de partida (PNIPAM<sub>30k</sub>: 33 °C e PNIPAM<sub>17k</sub>: 35 °C). Esta tendência deve-se ao caráter hidrofílico da dextrana oxidada, que proporcionou um reforço das ligações de hidrogênio entre as moléculas de copolímero e água (Almeida et al., 2012). Os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> apresentaram o mesmo valor de temperatura de transição de fase (34 °C), indicando que ambos têm similaridade no balanço hidrofílico/ hidrofóbico, o que corrobora com os resultados de CAC.

A influência do comprimento das cadeias de PNIPAM na temperatura de transição também é observada ao comparar os valores de LCST dos copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> (34 °C) e D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> (37 °C). As interações intercadeias e a variação de entropia do sistema aumentam quanto maior for o comprimento da cadeia de PNIPAM, o que acarreta menores valores de LCST (Pamies et al., 2009; Pasparakis; Tsitsilianis, 2020). Patrizi et al. (2009) sintetizaram copolímeros de dextrana-*g*-PNIPAM via polimerização radicalar controlada por transferência de átomo (ATRP) e relataram a mesma tendência de LCST menores para copolímeros com cadeias maiores de PNIPAM.

Ao analisar a variação do diâmetro médio com o aumento da temperatura foi observada uma redução no tamanho das partículas para todos os copolímeros (Figura 32), resultado da desidratação e contração das cadeias de PNIPAM. A copolimerização causou uma alteração no ajuste estrutural interno entre as moléculas levando a uma tendência contrária à observada para os PNIPAM-NH<sub>2</sub> (Figura 26B e 27B) (Lencina et al., 2014). Comportamento semelhante de redução do tamanho de partículas com o aumento da temperatura foi observado para copolímeros de galactomanana-*g*-PNIPAM (Gomes et al., 2020; Lima et al., 2021) e alginato-*g*-PNIPAM (Vasile; NITA, 2011) e pode ser influenciado pelo percentual de enxertia e pelo comprimento das cadeias de PNIPAM.

Vasile e Nita (2011) reportaram para copolímeros de alginato-*g*-PNIPAM que a diminuição ou o aumento do tamanho de partículas é dependente do percentual de PNIPAM no copolímero. Copolímeros com baixo percentual de PNIPAM, 25% (m/m), tenderam a ter o tamanho de partículas aumentado com o aquecimento, enquanto os copolímeros com alto conteúdo de PNIPAM, 43% m/m, mostram comportamento inverso.

Yang et al. (2013) relataram que geralmente a redução abrupta do

tamanho de partículas é encontrada em copolímeros com cadeias laterais longas, enquanto o aumento do tamanho pode ser observado em copolímeros com cadeias laterais curtas.

A acentuada redução no tamanho e o aumento na taxa de contagem com o aumento da temperatura confirmaram a termossensibilidade dos copolímeros e a capacidade de auto-organização em nanopartículas. Os copolímeros a partir da temperatura de transição formaram nanopartículas com tamanhos menores que 250 nm, o que os tornam promissores para o uso como sistemas de liberação de fármacos.

### 5.6.5 Sensibilidade ao pH do meio

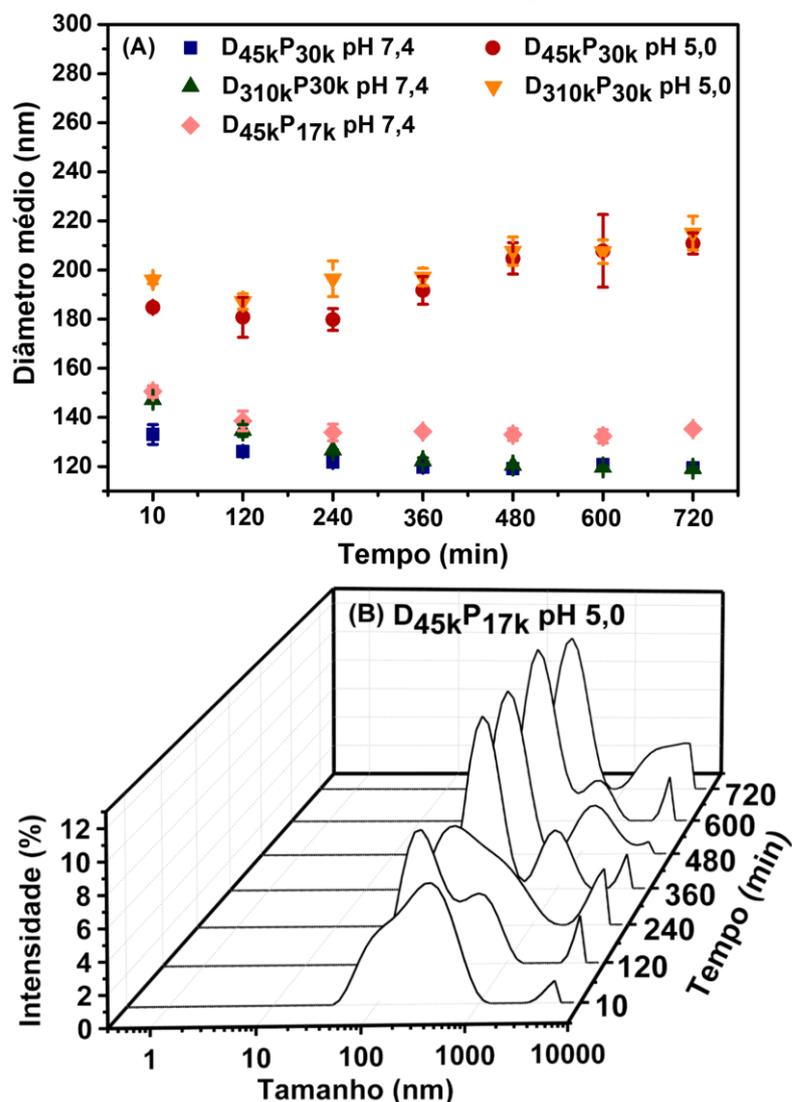
A sensibilidade dos copolímeros à variação do pH foi estudada monitorando-se mudanças no tamanho de partículas em PBS 7,4 e PBS 5,0 a 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 720 min, a 37 °C (Figura 33).

Após aquecer as soluções dos copolímeros a 37 °C por 10 min em PBS 7,4 foram formadas nanopartículas de 133 ± 4 (D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>), 147 ± 1 (D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub>) e 151 ± 2 nm (D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub>), com distribuição de tamanho unimodal. Nas primeiras horas foi observada uma redução no tamanho e manteve-se sem variação significativa a partir de 2, 4 e 6 h para os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub>, respectivamente (Figura 32A). A redução do diâmetro médio pode ser atribuída à desidratação progressiva das cadeias do PNIPAM. Este comportamento demonstra que a integridade das nanopartículas é mantida e que a base de *Schiff* entre a dextrana oxidada e o PNIPAM é relativamente estável em pH 7,4.

Em pH 5,0, a distribuição de tamanho das nanopartículas dos copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> permaneceu unimodal, porém com tamanhos maiores que em pH 7,4. Os diâmetros médios para os copolímeros D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> e D<sub>310k</sub>P<sub>30k</sub> após aquecimento de 10 min a 37 °C em PBS 5,0 foram 184,8 ± 0,2 e 196,0 ± 1,6 nm. A clivagem, em meio ácido, das ligações iminas entre as cadeias laterais de PNIPAM e a dextrana oxidada proporcionou um aumento da hidrofobicidade levando ao intumescimento das nanopartículas. Já para o copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub>, foi observada uma separação das bandas de distribuição de tamanho ao longo do tempo (Figura 32B), sugerindo separação dos componentes das nanopartículas em meio ácido. Estes resultados mostraram que as nanopartículas

se tornaram instáveis em meio ácido devido à clivagem das ligações iminas, confirmando a propriedade pH-responsiva dos copolímeros.

Figura 33 – (A) Variação do diâmetro médio em função do tempo para os copolímeros em PBS 7,4 e 5,0 a 37 °C e (B) distribuições de tamanho para o copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> em PBS 5,0 a 37 °C em função do tempo



Fonte: dados da pesquisa.

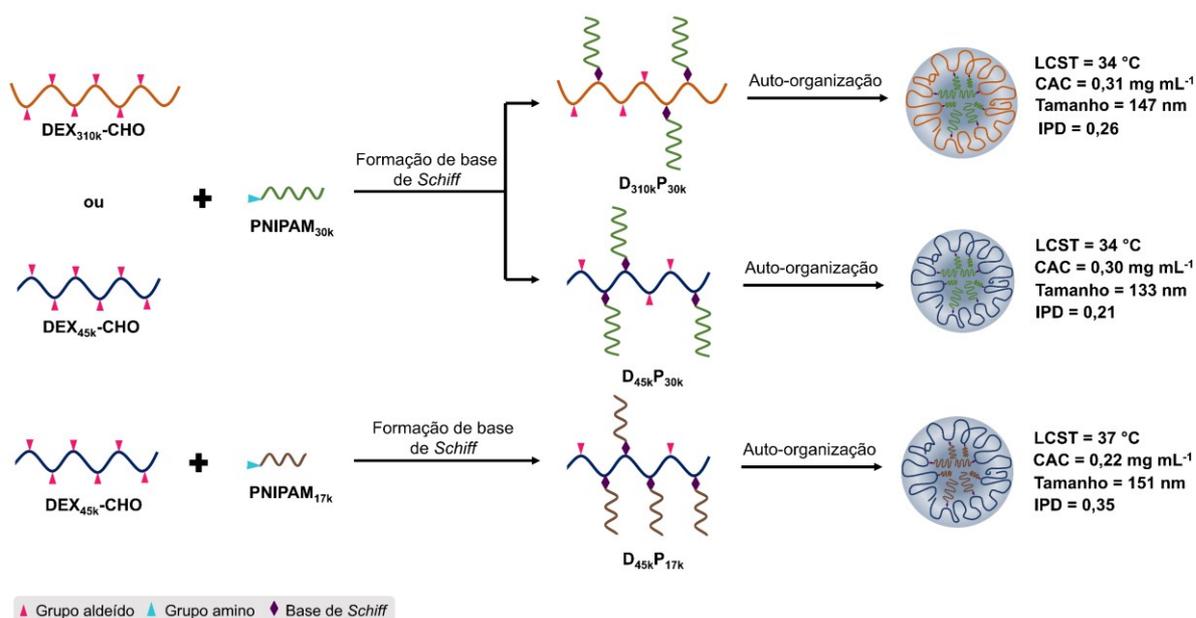
Comportamentos semelhantes foram observados por Kong et al. (2020) que sintetizaram derivados anfífilos via reação de formação de base de *Schiff* entre celulose oxidada e compostos aminados com diferentes comprimentos de cadeia carbônica (hexilamina, oleilamina e rodamina). As nanopartículas formadas por auto-organização eram estáveis em pH 7,0, enquanto em meio ácido (pH 4,0) a ruptura das cadeias laterais a partir da clivagem da base de Schiff, que se inicia na

superfície da nanopartícula e prossegue lentamente para o seu interior, proporcionou um aumento da hidrofiliidade levando ao intumescimento das nanopartículas. Os autores observaram que quanto maiores eram as cadeias laterais dos derivados, mais difícil era a entrada de íons  $H^+$  no interior das nanopartículas para a desestruturação dos núcleos hidrofóbicos.

## 5.7 Resumo geral dos copolímeros

Na Figura 34, tem-se uma ilustração geral dos copolímeros sintetizados via reação de formação de base de *Schiff*, destacando as principais características de cada sistema.

Figura 34 – Esquema geral dos copolímeros sintetizados e suas principais características



Fonte: elaborada pela autora.

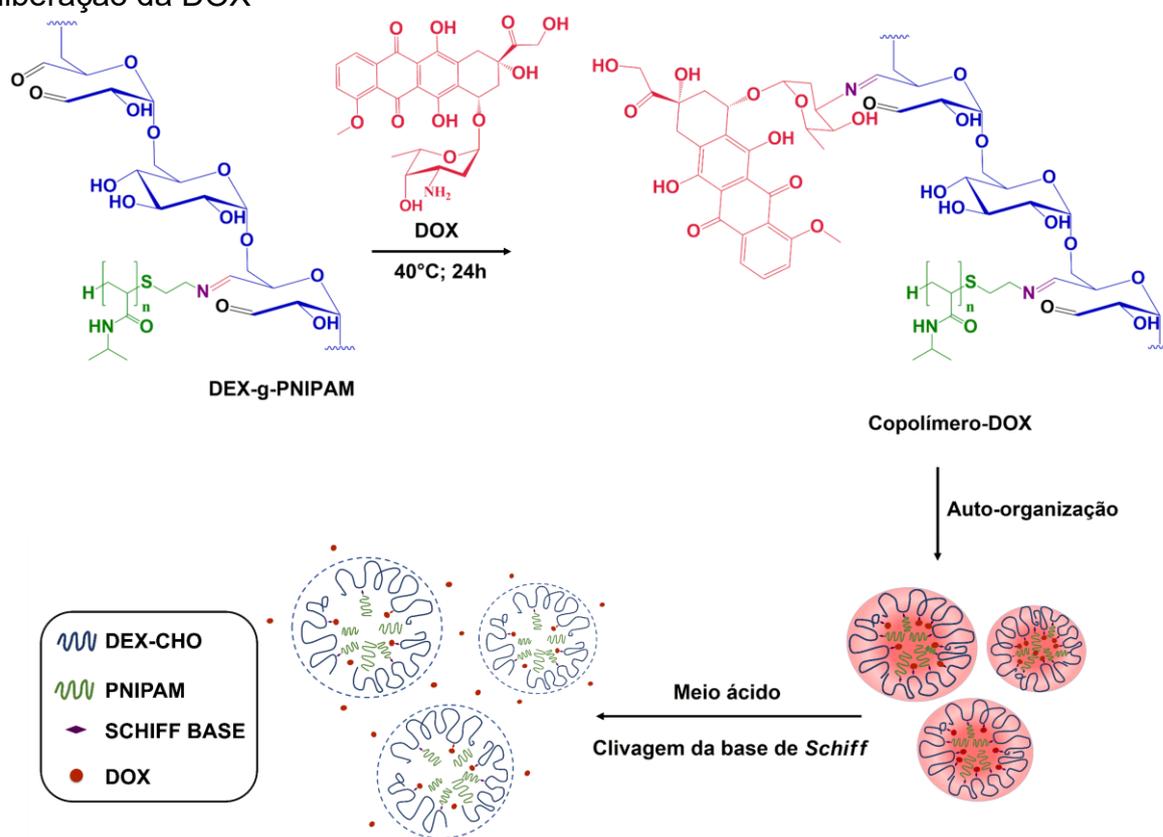
Para identificar o copolímero mais adequado para a conjugação do quimioterápico doxorrubicina na etapa seguinte do estudo, os dados de LCST, CAC, tamanho de partículas e IPD foram avaliados. Os três copolímeros mostraram capacidade de auto-organização em nanopartículas, com propriedades termorresponsivas e pH-responsivas. O tamanho de partículas e o índice de polidispersão são parâmetros importantes no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos. Tamanho de partículas menor que 200 nm é vantajoso para acúmulo e penetração nos tecidos tumorais, e IPD baixo indica que as

nanopartículas apresentam tamanhos mais próximos. O copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> apresentou menores valores de tamanho de partículas e de IPD em comparação com os demais copolímeros, o que o torna promissor para a conjugação com a doxorubicina.

## 5.8 Preparação das nanopartículas copolímero-DOX

Por ser um dos quimioterápicos mais eficientes e com uma amina primária na sua estrutura, a doxorubicina foi escolhida como fármaco modelo para preparar sistemas transportadores a partir do copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>. O fármaco foi conjugado aos copolímeros através da formação da base de *Schiff* entre o grupo amino da doxorubicina e os grupos aldeído residuais dos copolímeros (Figura 35). A estabilidade da base de *Schiff* diminui à medida que o pH do meio reduz, o que torna possível uma maior liberação do fármaco a partir da clivagem das ligações iminas em ambiente tumoral (Zhao et al., 2017; Su et al., 2018; Curcio et al., 2020).

Figura 35 – Ilustração esquemática da preparação de nanopartículas de copolímero-DOX por auto-organização e clivagem da base de *Schiff* em meio ácido, causando a liberação da DOX



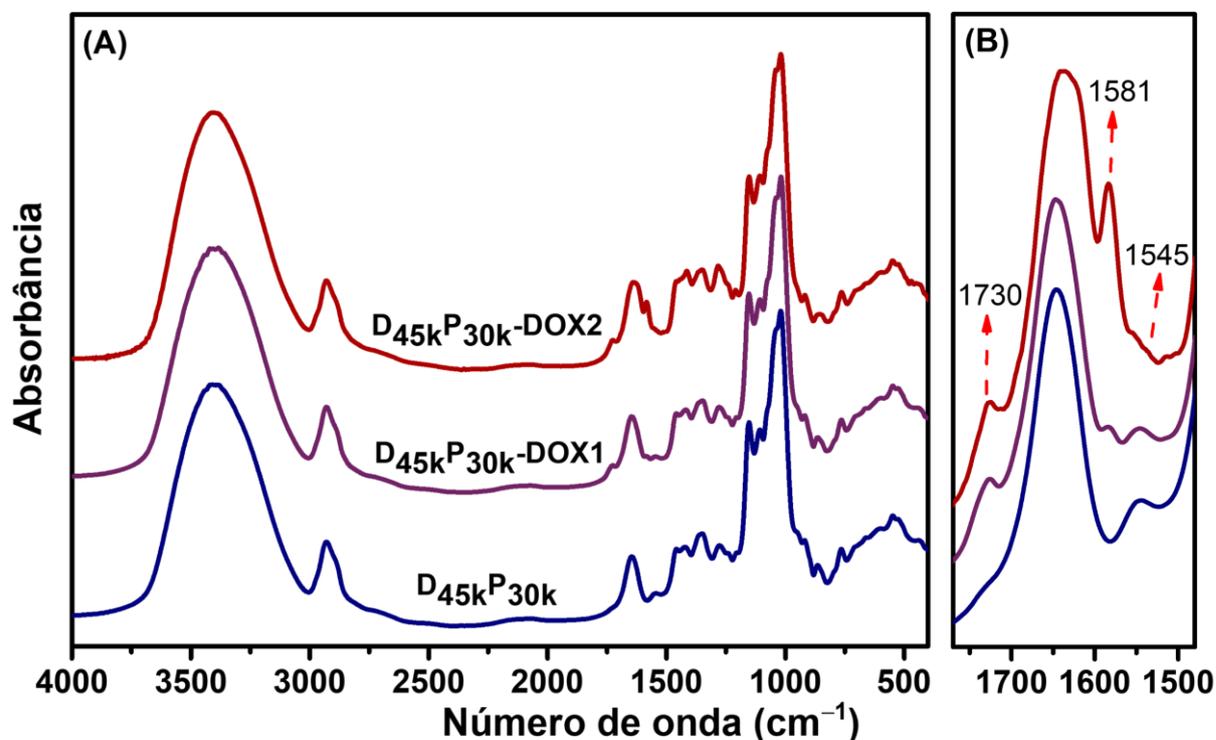
Fonte: elaborada pela autora.

## 5.9 Caracterização das nanopartículas carregadas com doxorrubicina

### 5.9.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

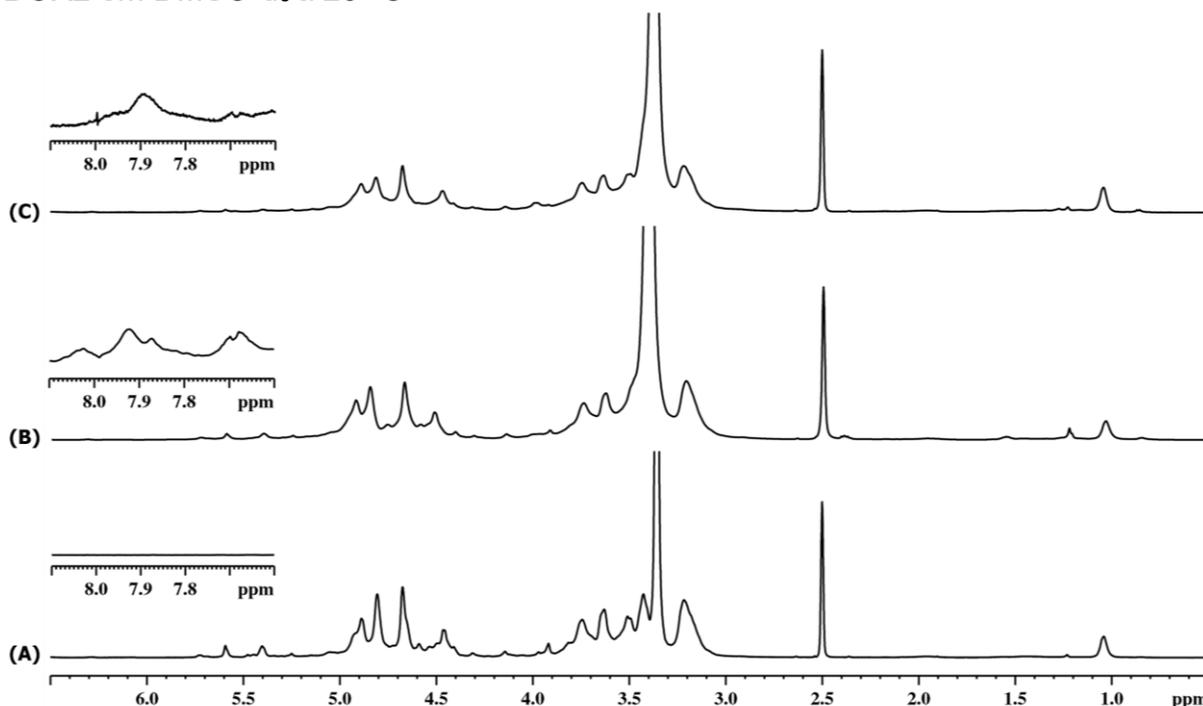
A estrutura química das nanopartículas carregadas com doxorrubicina foi examinada por FTIR (Figura 36) e RMN  $^1\text{H}$  (Figura 37). Em comparação aos espectros de FTIR do copolímero sem fármaco, uma nova banda foi observada em  $1581\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de estiramento C=C dos anéis aromáticos presentes na estrutura da DOX. Além disso, o aparecimento da banda em  $1730\text{ cm}^{-1}$  deve-se à existência de carbonila de cetona na DOX (Gao et al., 2017). No espectro de RMN  $^1\text{H}$  a presença de DOX pode ser confirmada pelo aparecimento dos sinais na região entre  $\delta = 7,60$  e  $8,00$  ppm, atribuídos aos prótons dos anéis aromáticos presentes na estrutura do fármaco (Curcio et al., 2020).

Figura 36 – (A) Espectros de FTIR do copolímero  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$  e das nanopartículas  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$  e  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$  e (B) zoom da região de  $1770$  a  $1480\text{ cm}^{-1}$



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 37 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do (A)  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}$ , (B)  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$  e (C)  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$  em  $\text{DMSO-d}_6$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: dados da pesquisa.

### 5.9.2 Eficiência de carregamento de fármaco (ECF) e a carga de fármaco (CF)

A eficiência de carregamento de fármaco e a carga de fármaco das nanopartículas  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$  e  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$  foram determinadas por espectrofotometria na região do UV-vis e os dados estão mostrados na Tabela 10. Maiores valores de ECF e CF foram obtidos para as nanopartículas  $\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$ , o que pode ser atribuído a maior quantidade de DOX utilizada no processo de preparação que favoreceu a reação de formação de base de *Schiff* entre o fármaco e o copolímero. O aumento da concentração de DOX em duas vezes resultou num aumento de três vezes no valor da CF.

Tabela 10 – Eficiência de carregamento e carga de fármaco das nanopartículas carregadas com doxorrubicina

Nanopartículas	ECF (%)	CF (%)
$\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX1}$	$41,7 \pm 4,4^a$	$3,8 \pm 0,4^a$
$\text{D}_{45\text{k}}\text{P}_{30\text{k}}\text{-DOX2}$	$78,4 \pm 3,7^b$	$13,1 \pm 0,6^b$

Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Fonte: dados da pesquisa.

O valor de CF das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1 foi próximo ao obtido para conjugados de DEX-DOX (CF 4,5 ± 0,2%) sintetizados via reação de formação de base de *Schiff* por Sagnella et al. (2014), utilizando condições de síntese semelhantes ao presente trabalho. Os autores utilizaram 10% (m/m) de doxorrubicina, a temperatura ambiente por 24 h, em DMSO.

As nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 apresentaram maiores valores de ECF (78,4 ± 3,7%) e CF (13,1 ± 0,6) que os obtidos por Li et al. (2017) (ECF 24,0 e 19,2%; CF 9,56 e 9,99%) e Li et al. (2020) (ECF 45,7% e CF 7,8%) para conjugados de dextrana-DOX que também foram sintetizados via reação de formação de base de *Schiff*, porém em condições diferentes de síntese. Li et al. (2017) usaram 50% (m/m) de DOX, 72 h de reação a 50 °C, em tampão acetato e Li et al. (2020) usaram 58% (m/m) de DOX, 24 h de reação a 60 °C, em DMSO.

As condições de síntese utilizadas no presente trabalho proporcionaram a obtenção de nanopartículas com valores de ECF e CF similares ou maiores comparados aos conjugados à base de dextrana e DOX reportadas na literatura. Portanto, os resultados indicam que a condição de síntese utilizando 20% (m/m) de DOX, 24 h de reação a 40 °C, em DMSO, mostrou-se mais eficiente.

### 5.9.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O diâmetro médio e IPD das nanopartículas sem DOX e carregadas com DOX foram medidos por DLS em PBS 7,4 a 37 °C. Os valores de diâmetro médio foram menores que 200 nm e de IPD foram inferiores a 0,4, indicando boa homogeneidade de tamanho (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores de diâmetro médio e IPD para as nanopartículas sem DOX e carregadas com DOX

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm)*	IPD*
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub>	133 ± 4 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
D <sub>310k</sub> P <sub>30k</sub>	147 ± 1 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
D <sub>45k</sub> P <sub>17k</sub>	151 ± 2 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>c</sup>
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX1	105 ± 5 <sup>c</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2	85 ± 5 <sup>d</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>c</sup>

\* Medidos por DLS em PBS 7,4 a 37 °C, após aquecimento de 10 min. Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas (α=0,05). Fonte: dados da pesquisa.

A variação da massa molar da dextrana e do PNIPAM influenciaram no tamanho das nanopartículas. A dextrana de maior massa molar e o PNIPAM de menor comprimento de cadeia levaram à formação de nanopartículas maiores. O copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>17k</sub> apresentou maior grau de enxertia devido ao menor impedimento estérico das cadeias de menor comprimento (PNIPAM<sub>17k</sub>). E isto pode ter proporcionado a formação de núcleos hidrofóbicos maiores. Blanco-Fernandez et al. (2017) sintetizaram copolímeros de dextrana enxertada com PNIPAM via ATRP e obtiveram nanopartículas com tamanho de  $176 \pm 21$  nm a 37 °C. Comparado aos PNIPAM-NH<sub>2</sub> utilizados no presente trabalho, o PNIPAM-NH<sub>2</sub> utilizado pelos autores possui menor massa molar ( $M_w = 4,7 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup>), o que pode ter proporcionado uma maior enxertia e conseqüente formação de núcleos hidrofóbicos maiores.

Ao incorporar doxorrubicina, 10 e 20% (m/m), no copolímero D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> foram formadas nanopartículas menores. A maior carga de fármaco resultou em nanopartículas 36% menores que as nanopartículas sem fármaco. Essa tendência de redução do tamanho pode ser devido ao aumento das interações entre as porções hidrofóbicas que levaram a formação de núcleos menores (Huang et al., 2018).

As nanopartículas mostraram tamanhos adequados (< 200 nm) para administração intravenosa e para promover o acúmulo de medicamentos em tumores através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (Ferrari et al., 2018; Wu, 2021).

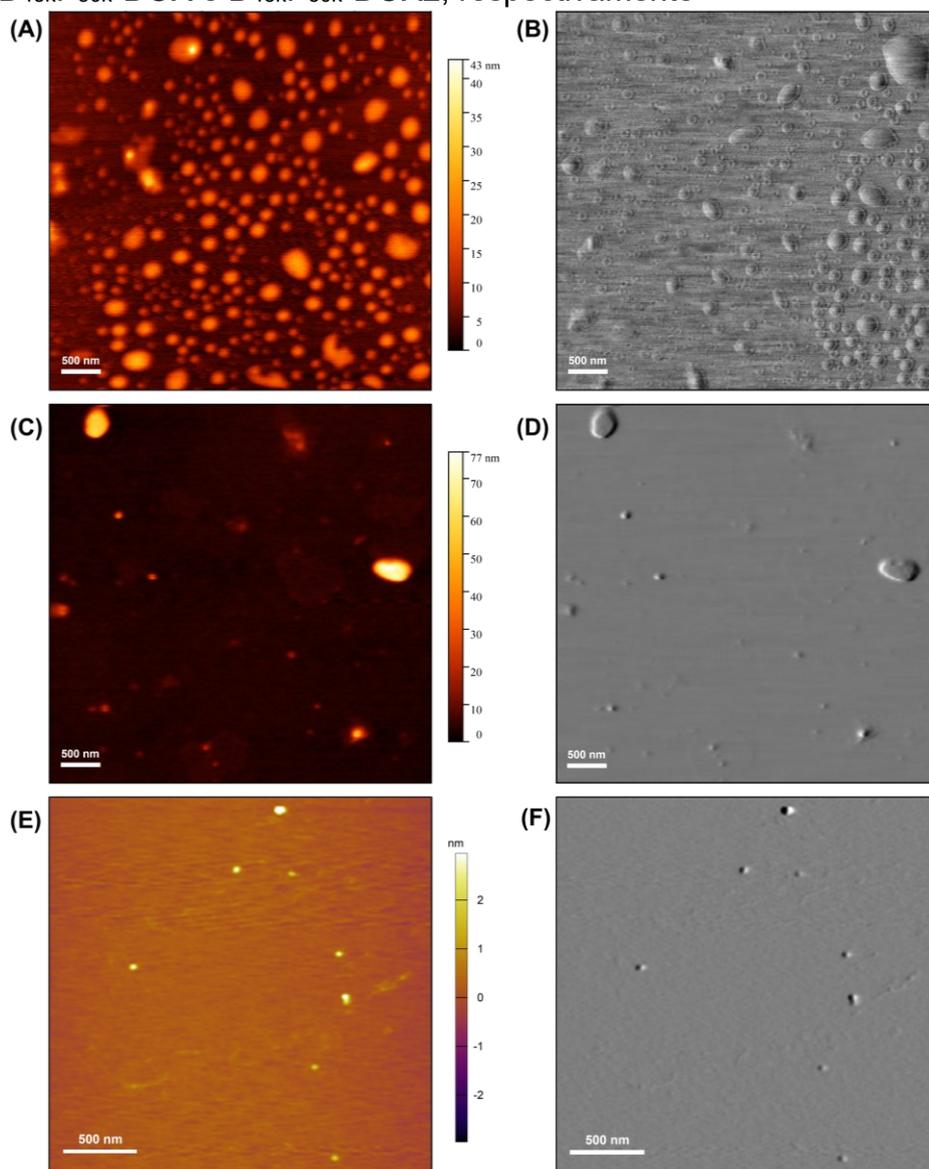
O tamanho dos sistemas de entrega de medicamentos influencia na distribuição nos tecidos e na depuração plasmática. Nanocarreadores projetados para aplicação intravenosa devem apresentar uma faixa definida de tamanhos variando de 30 a 300 nm para garantir um tempo de circulação sistêmica prolongado do transportador. Sistemas com tamanhos > 300 nm podem provocar trombose e serem eliminados pelo sistema reticuloendotelial, enquanto partículas menores que 10 nm podem ser rapidamente eliminadas pelos rins (Ferrari et al., 2018).

O tamanho das partículas também é um importante parâmetro empregado para direcionar passivamente princípios ativos aos tumores. Em relação aos tecidos normais, os vasos sanguíneos dos tecidos tumorais mostram um aumento no número e tamanho dos poros, permitindo o acúmulo de nanopartículas (< 200 nm) no interstício do tumor, fenômeno conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (Steichen et al., 2013; Wu, 2021).

#### 5.9.4 Microscopia de força atômica (MFA)

A morfologia e o tamanho das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ ,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 foram observados por MFA. As micrografias (Figura 38) mostraram que as nanopartículas são esféricas. Os tamanhos das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ ,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 foram de 14, 21 e 42 nm, respectivamente, valores bem menores que os obtidos por DLS. A diferença nos tamanhos obtidos por MFA e DLS pode ser justificada pelo fato da análise por MFA ser realizada com a amostra seca e os dados fornecidos pelo DLS são das nanopartículas em solução.

Figura 38 – Imagens de microscopia de força atômica de altura (A, C e E) e de amplitude (B, D e F) das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ ,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2, respectivamente

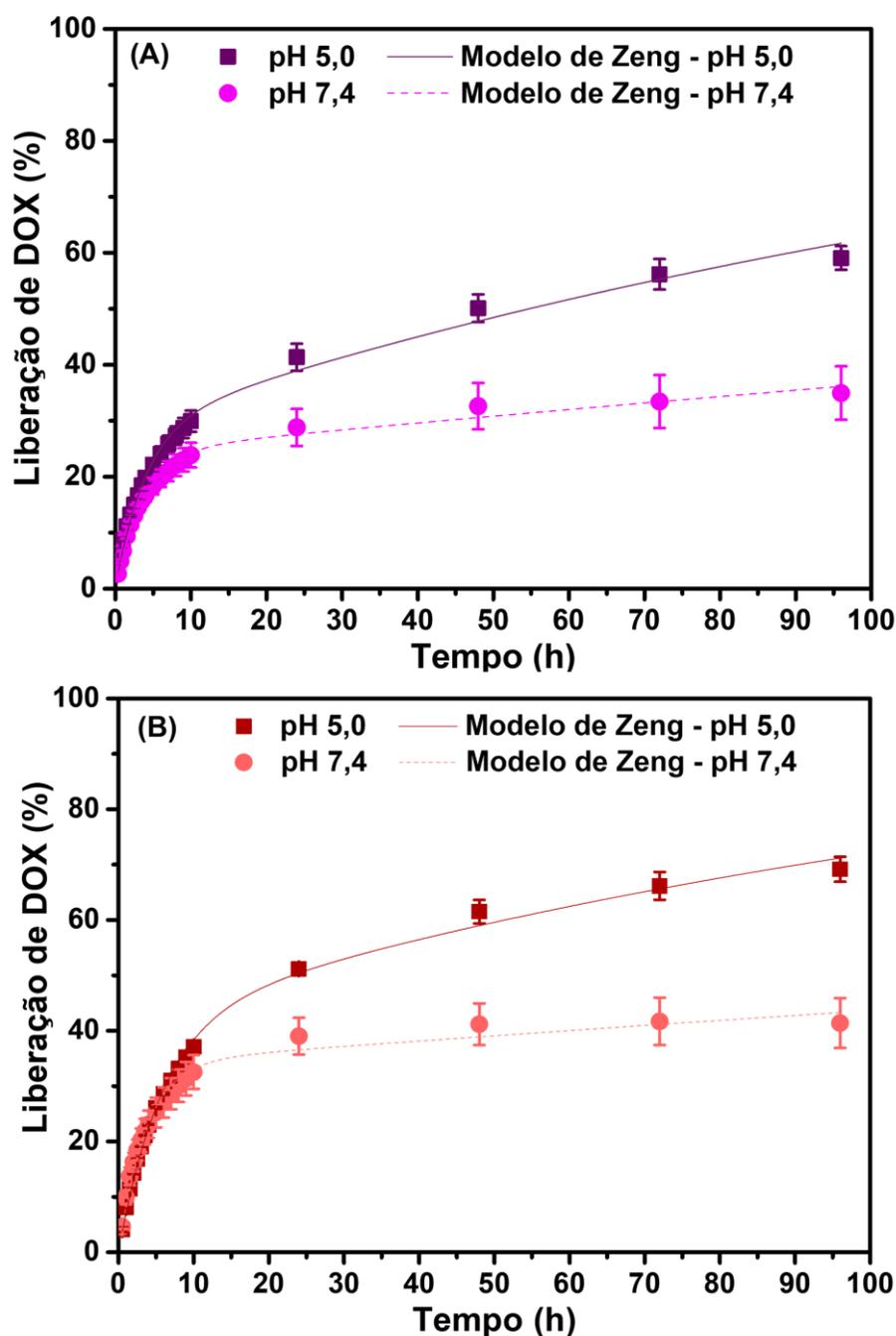


Fonte: dados da pesquisa.

### 5.9.5 Estudo de liberação *in vitro* da doxorrubicina

A influência do pH no percentual de liberação de DOX das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1 (Figura 39A) e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 (Figura 39B) foi investigada em PBS 7,4 e 5,0 contendo LSS a 0,1% a 37°C.

Figura 39 – Perfil de liberação *in vitro* da DOX das nanopartículas (A) D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1 e (B) D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 em PBS 7,4 e 5,0 contendo LSS 0,1% a 37 °C



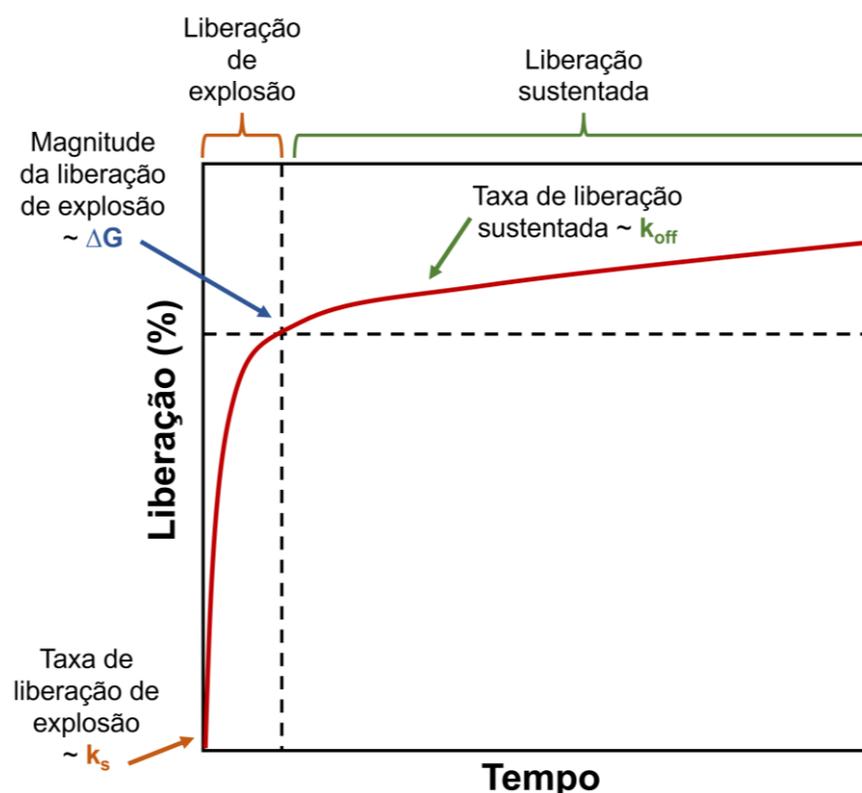
Fonte: dados da pesquisa.

A liberação de DOX das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 em pH 7,4 (condição normal dos tecidos e do sangue), após 96 h, foi de  $35 \pm 5$  e  $41 \pm 5\%$ , respectivamente. Enquanto, em pH 5,0 (condição do compartimento endossômico), foi de  $59 \pm 2$  e  $69 \pm 2\%$ . O maior percentual de DOX liberado pelas nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2, possivelmente deve-se ao seu menor tamanho (85 nm) em comparação com as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX (105 nm). Nanopartículas de menores tamanhos possuem maior área de contato com o meio levando a uma maior liberação do fármaco (Rizvi; Saleh, 2018) .

Em pH 5,0, as ligações iminas são menos estáveis, levando à clivagem parcial da ligação entre a DOX e o copolímero e entre a dextrana oxidada e as cadeias de PNIPAM-NH<sub>2</sub>. Ambos os fatores podem contribuir para a maior porcentagem de DOX liberada em um ambiente ácido. Estes resultados sugerem que as nanopartículas carregadas com DOX podem ser relativamente estáveis no plasma após serem administradas por via intravenosa, permitindo um tempo de circulação sanguínea prolongado com reduzida liberação de DOX. Além disso, podem promover uma maior liberação do quimioterápico no ambiente intratumoral, possibilitando uma redução dos efeitos colaterais (Li et al., 2016). As nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 mostraram perfil de liberação dependente do pH, o que sugere potencial para uso como sistemas de entrega de fármacos anticâncer.

A cinética de liberação de DOX das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX1 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 foi estudada utilizando o modelo cinético de Zeng (Equação 11). Esse modelo considera tanto o processo de difusão do fármaco quanto as interações fármaco-carreador, e os parâmetros cinéticos ( $k_s$  – constante de difusão,  $k_{off}$  – constante de dissociação e  $\Delta G$  – diferença de energia livre de Gibbs entre os estados livre e ligado) podem ser utilizados para explicar o processo de liberação. A correlação desses parâmetros com o perfil de liberação de um medicamento modelo pode ser observada na Figura 40. O processo de difusão do fármaco é mais rápido que os processos de associação e dissociação. Na fase inicial da liberação (liberação de explosão) as moléculas de fármaco não ligadas são liberadas. Posteriormente, o estágio da liberação sustentada é ditado pelo processo de dissociação e o percentual de liberação desse estágio é proporcional ao  $k_{off}$ . Estudos de parâmetros mostraram que o  $\Delta G$  é proporcional à quantidade de fármaco liberado na fase inicial da liberação, fornecendo informação da interação fármaco-carreador (Zeng et al., 2011; Ioniță et al., 2022).

Figura 40 – Correlação dos parâmetros cinéticos do modelo de Zeng com um perfil de liberação de um medicamento modelo



Fonte: adaptado de Ioniță et al. (2022).

Os parâmetros cinéticos  $k_s$ ,  $k_{on}$  e  $k_{off}$  da liberação de DOX das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 foram determinados ajustando os dados de liberação à equação 11. O  $\Delta G$  foi calculado a partir da equação 12 e os valores obtidos estão mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros cinéticos da liberação de DOX das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2

Nanopartículas	pH	Parâmetros				$R^2$
		$k_s$	$k_{on}$ ( $h^{-1}$ )	$k_{off}$	$\Delta G$ ( $10^{-21}$ J)	
<b><math>D_{45k}P_{30k}</math>-DOX1</b>	7,4	0,2746	0,0053	0,0017	-4,86	0,9907
	5,0	0,2514	0,0160	0,0065	-3,85	0,9895
<b><math>D_{45k}P_{30k}</math>-DOX2</b>	7,4	0,2799	0,0030	0,0016	-2,70	0,9823
	5,0	0,1722	0,0103	0,0074	-1,40	0,9954

Fonte: dados da pesquisa.

O mecanismo de liberação do fármaco pode ser resumido como uma liberação rápida do fármaco livre por meio de difusão, seguido de uma liberação lenta do fármaco ligado por meio do processo de dissociação, visto que  $k_s \gg k_{on}$  e  $k_s \gg k_{off}$ , como observado na Tabela 12. Os valores negativos de  $\Delta G$  observados para ambas as nanopartículas indicam uma forte interação fármaco-carreador. Para as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 foram observados maiores valores de  $\Delta G$ , em ambos os pHs, o que corrobora com o maior percentual de DOX liberado na fase inicial do processo de liberação, em comparação com as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1. Em pH 5,0, para os dois sistemas observaram-se valores de  $\Delta G$  maiores que em pH 7,4, o que indica enfraquecimento da interação fármaco-carreador e corrobora com o maior percentual de DOX liberado em condições ácidas. Além disso, maiores valores de  $k_{off}$  foram observados em pH 5,0, o que se deve ao meio ácido favorecer a clivagem das ligações iminas promovendo a maior liberação de DOX.

### 5.9.6 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ ,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 e da DOX livre em células L929 (linhagem não tumoral de fibroblasto murino) e HCT-116 (câncer de colorretal) foi avaliada pelo ensaio de MTT, após 72 h de incubação (Tabela 13 e APÊNDICE F). Na Tabela 13, estão apresentados os valores de  $CI_{50}$  das nanopartículas e da DOX livre nas linhagens testadas.

Tabela 13 – Valores de  $CI_{50}$  das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 e DOX livre pelo ensaio MTT após 72 h de incubação

Linhagens celulares	$CI_{50}$ ( $\mu g mL^{-1}$ )		
	Intervalo de confiança (95%)		
	$D_{45k}P_{30k}$ -DOX*	$D_{45k}P_{30k}$ -DOX2*	DOX livre
L929	> 19	5,22 (4,35 – 6,35)	0,27 (0,24 – 0,30)
	9,03 (5,57 – 18,9)	1,67 (1,47 – 2,17)	0,12 (0,09 – 0,17)

\*Concentração de DOX.

Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$  (sem fármaco) não apresentaram citotoxicidade às células testadas, com valor de  $CI_{50} > 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Enquanto as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 mostraram maior citotoxicidade em células cancerosas que em célula não tumoral, o que corrobora com os resultados do ensaio de liberação *in vitro* que mostrou um maior percentual de liberação de DOX em meio ácido devido a clivagem das ligações iminas. Estes resultados podem ser um indicativo de seletividade em relação às células cancerígenas e potencializam o uso destas nanopartículas como carreadores de fármacos anticâncer, visto que poderiam minimizar os efeitos colaterais causados pela quimioterapia às células saudáveis.

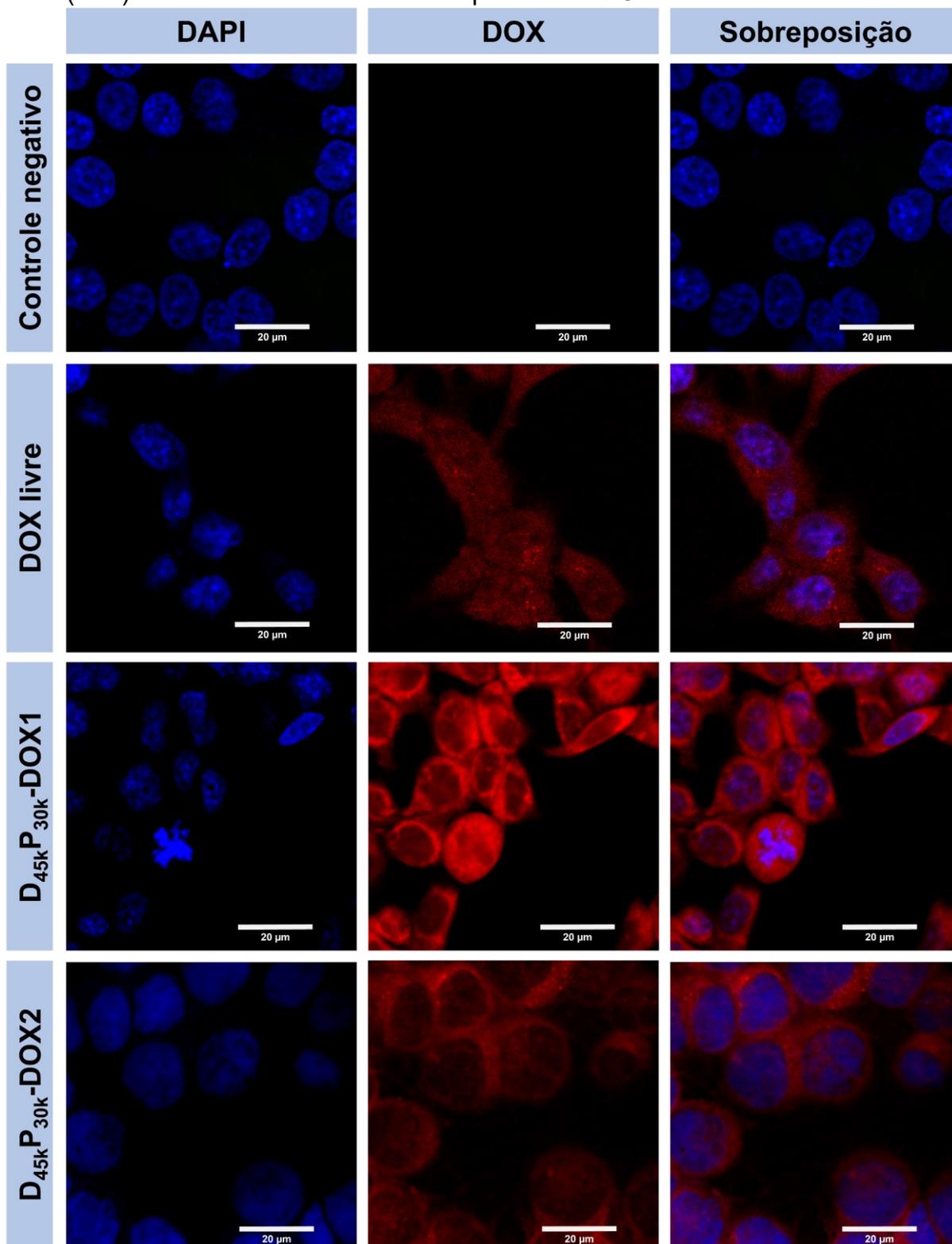
As nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 que possuem maior carga de fármaco apresentaram maior citotoxicidade em comparação às nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 em ambas as linhagens testadas, o que pode ser devido ao maior percentual de DOX liberado pelas nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2. Li et al. (2016) sintetizaram pró-fármacos de hidroxietilamido-doxorrubicina com diferentes cargas de fármaco e a maior citotoxicidade apresentada pelo pró-fármaco com maior carga de fármaco foi atribuída à maior liberação intracelular seletiva.

As nanopartículas carregadas com DOX apresentaram valores de concentração inibitória média maiores que a DOX livre. Alguns autores também observaram um aumento da  $CI_{50}$  após a incorporação do fármaco em nanocarreadores e este comportamento tem sido atribuído à cinética de liberação lenta, bem como à lenta internalização nas células (Sagnella et al., 2014; Li et al., 2016; Zhang et al., 2020). Apesar do maior valor de  $CI_{50}$ , as nanopartículas carregadas com DOX apresentaram vantagens em relação ao fármaco livre, como tamanho adequado para se acumular passivamente por efeito EPR, uma liberação controlada sensível ao pH do meio e menor citotoxicidade em células normais.

### **5.9.7 Ensaio de captação celular**

A captação celular da DOX livre e das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 foi investigada qualitativamente em células HCT-116 por microscopia confocal de varredura a laser (Figura 41).

Figura 41 – Captação celular da DOX livre e das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 após incubação com células HCT-116 por 24 h observadas por microscopia confocal de varredura a laser. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) e a fluorescência vermelha representa a DOX



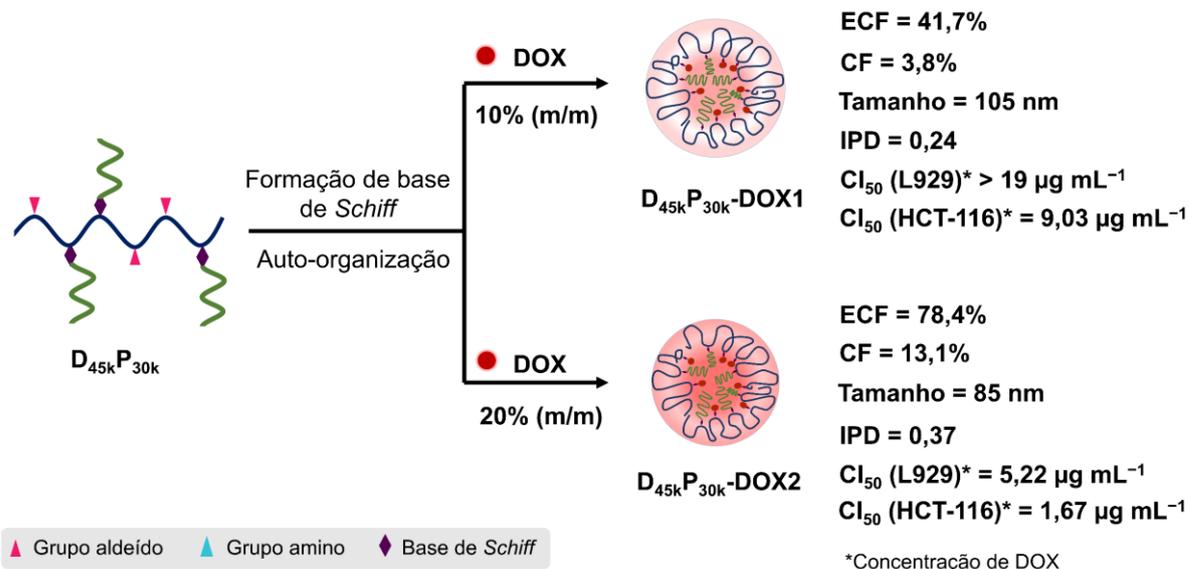
Fonte: dados da pesquisa.

As imagens de fluorescência mostraram que após 24 h de incubação, a DOX livre e as nanopartículas estavam distribuídas no citoplasma e no núcleo, com maior localização das nanopartículas no citoplasma. Esses resultados sugerem que as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 podem ter sido internalizadas via endocitose, enquanto as moléculas de DOX livre podem se difundir através da membrana plasmática e nuclear. Além disso, a maior distribuição de nanopartículas no citoplasma em comparação com a DOX livre pode ser devido à liberação sustentada de DOX pelas nanopartículas em resposta ao ambiente ácido dos endossomos que pode promover a clivagem das ligações iminas (Cambón et al., 2013; Su et al., 2018). Comportamentos semelhantes também foram observados em outros nanocarreadores responsivos ao pH e justificado pela diferença no mecanismo de internalização da DOX livre e dos nanocarreadores, além da liberação lenta do fármaco pelos nanocarreadores (Su et al., 2018; Chen et al., 2019; Kong et al., 2020).

### 5.10 Resumo geral das nanopartículas copolímero-DOX

Na Figura 42, tem-se um esquema geral das nanopartículas obtidas da conjugação do copolímero  $D_{45k}P_{30k}$  com a doxorubicina, 10 ou 20% (m/m), via reação de formação de base de *Schiff*, e suas principais características.

Figura 42 – Esquema geral das nanopartículas copolímero-DOX preparadas e suas principais características



Fonte: elaborada pela autora.

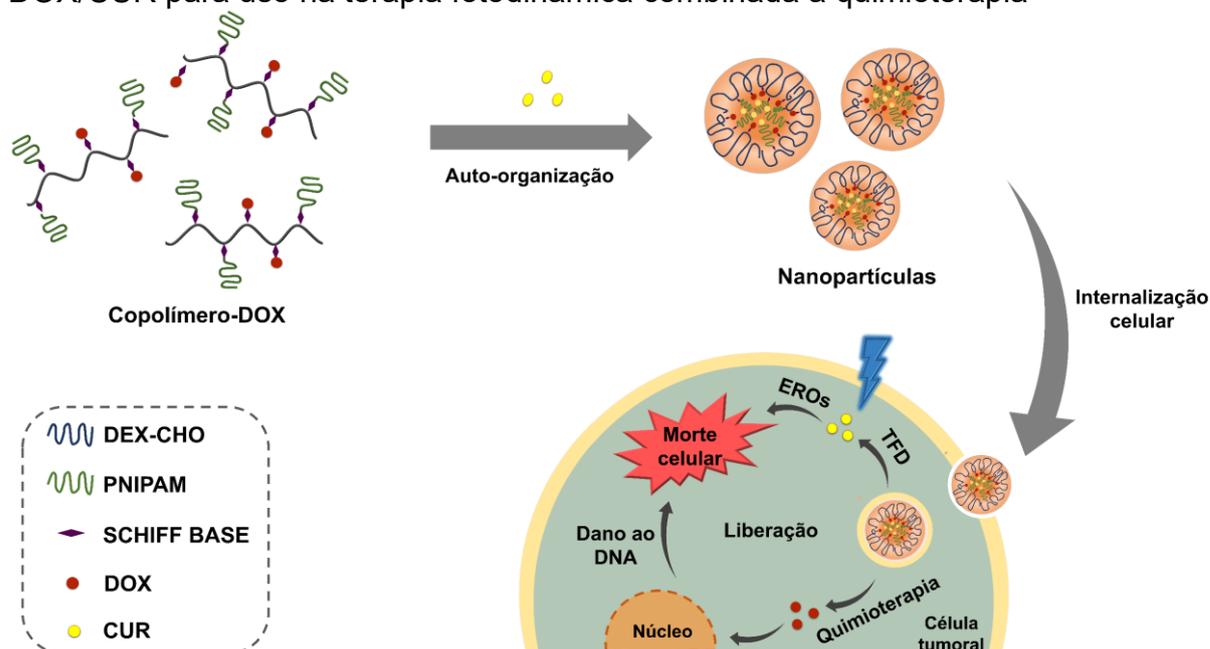
Para identificar as nanopartículas mais adequadas para a co-incorporação da curcumina e uso na terapia fotodinâmica combinada à quimioterapia na etapa seguinte do estudo, avaliou-se os dados de ECF, CF, tamanho de partículas, IPD e  $CI_{50}$  em células L929 e HCT-116. As nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 exibiram ECF e CF significativamente maiores em comparação com as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1. Isso indica que as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 podem transportar uma maior quantidade de doxorrubicina, melhorando a eficácia do tratamento. Além disso, as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 apresentaram menor tamanho de partículas, o que poderá facilitar o seu acúmulo nos tecidos tumorais e internalização nas células cancerosas, aumentando a eficácia terapêutica. As nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 mostraram maior citotoxicidade em células cancerosas que em células não tumorais, o que pode ser um indicativo de seletividade em relação às células cancerígenas. Além disso, as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 demonstraram atividade anticâncer superior, corroborando com sua maior CF e menor tamanho de partículas.

Com base nos maiores valores de ECF e CF, menor tamanho de partículas e atividade anticâncer superior, as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 mostraram-se mais adequadas para a co-incorporação da curcumina para uso na terapia fotodinâmica combinada à quimioterapia.

### **5.11 Preparação das nanopartículas copolímero-DOX/CUR**

A curcumina possui várias atividades farmacológicas e propriedade fotossensibilizante, porém apresenta limitações para aplicação clínica, como baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e limitada estabilidade química em condições fisiológicas. Então, para contornar esses problemas, a curcumina foi incorporada nas nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2, por interação não covalente com as porções hidrofóbicas, obtendo-se um nanocarreador para uso na terapia fotodinâmica combinada à quimioterapia (Figura 43).

Figura 43 – Ilustração esquemática da formação das nanopartículas copolímero-DOX/CUR para uso na terapia fotodinâmica combinada a quimioterapia



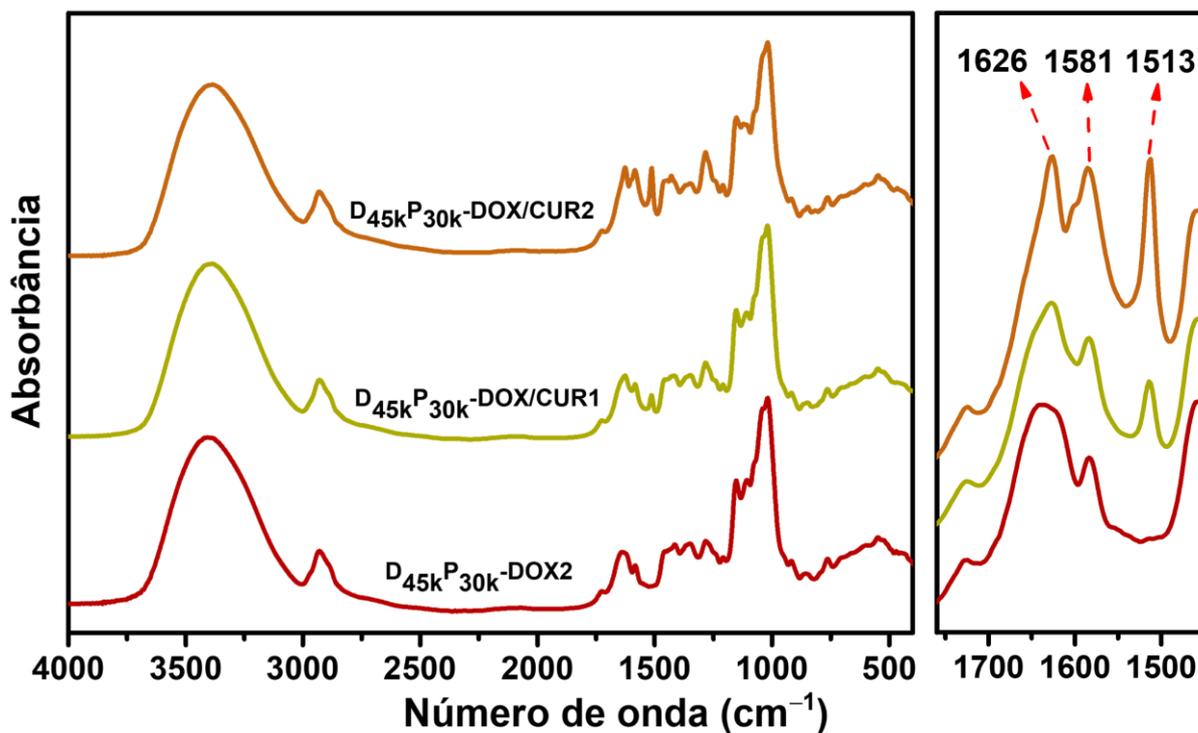
Fonte: elaborada pela autora.

## 5.12 Caracterização das nanopartículas carregadas com doxorubicina e curcumina

### 5.12.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1H$ )

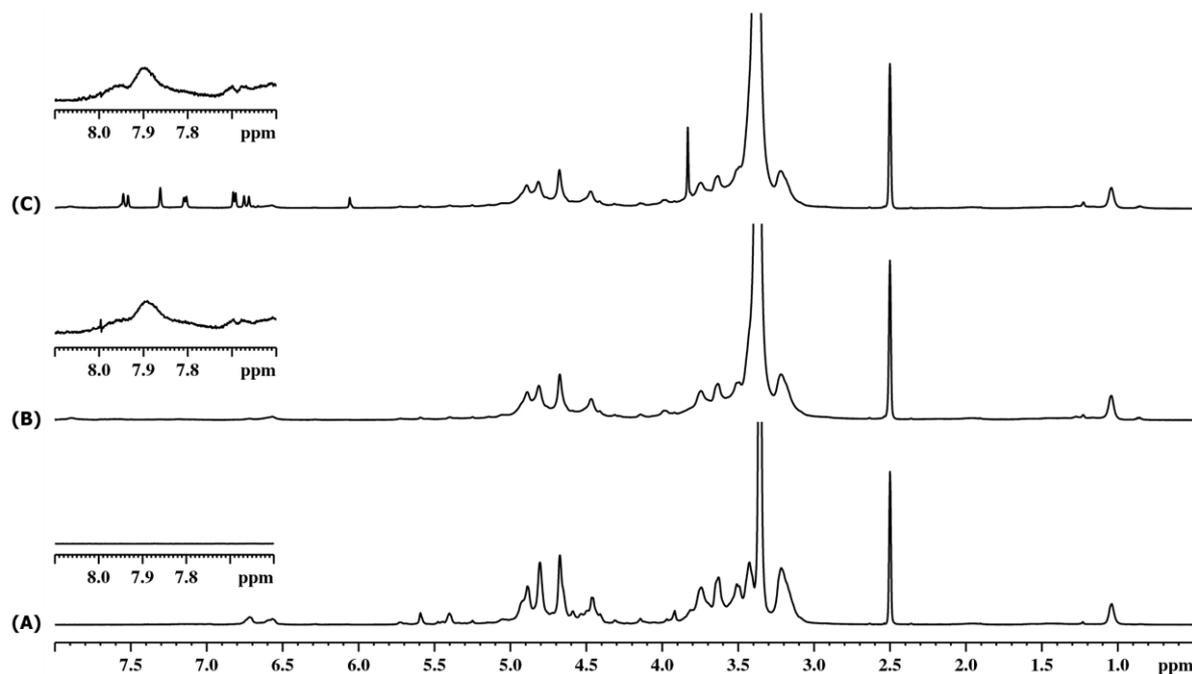
As nanopartículas carregadas com doxorubicina e curcumina foram caracterizadas por FTIR (Figura 44) e RMN  $^1H$  (Figura 45). Após a incorporação da curcumina, foi possível observar nos espectros de FTIR o aparecimento da banda em  $1513\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações de  $\nu$  (C=O),  $\delta$  (CC=C) e  $\delta$  (CC=O) (Kolev et al., 2005; Mangolim et al., 2014). As bandas em  $1581\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao  $\nu$  (C=C) dos anéis aromáticos e em  $1626\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao  $\nu$  (C=O conjugado) (Khodabakhshian et al., 2021). No espectro de RMN  $^1H$  foram observados novos sinais na região entre  $\delta = 6,70$  e  $7,60$  ppm, referentes aos prótons aromáticos, bem como em  $\delta = 3,83$  ppm, atribuídos aos prótons dos grupos metoxi presentes na estrutura da curcumina (Dey; Sreenivasan, 2015; Prasad et al., 2020).

Figura 44 – Espectros de FTIR das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2,  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR1 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 45 – Espectros de RMN  $^1H$  do (A)  $D_{45k}P_{30k}$ , (B)  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 e (C)  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 em  $DMSO-d_6$



Fonte: dados da pesquisa.

### 5.12.2 Eficiência de carregamento de fármaco (ECF) e a carga de fármaco (CF)

Os valores de eficiência de carregamento de fármaco e de carga de fármaco das nanopartículas carregadas com DOX e CUR estão mostrados na Tabela 14. As nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 apresentaram maiores valores de ECF e CF em comparação com as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR1, isso pode ser devido a maior concentração de CUR na sua preparação que favoreceu as interações não-covalentes entre a curcumina e as porções hidrofóbicas (DOX e PNIPAM). O aumento da concentração de CUR em duas vezes promoveu um aumento da CF de quase três vezes.

Tabela 14 – Eficiência de carregamento e carga de fármaco das nanopartículas carregadas com doxorubicina e curcumina

Nanopartículas	ECF (%) de	CF (%) de	ECF (%) de	CF (%) de
	DOX	DOX	CUR	CUR
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR1	78,4 ± 3,7 <sup>a</sup>	12,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	41,0 ± 4,2 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,4 <sup>a</sup>
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2	78,4 ± 3,7 <sup>a</sup>	12,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	66,1 ± 4,1 <sup>b</sup>	11,0 ± 0,7 <sup>b</sup>

Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Fonte: dados da pesquisa.

Os valores de ECF e CF de CUR alcançados no presente estudo foram similares ou inferiores aos obtidos por Gao et al. (2017) para conjugados de alginato-DOX/CUR e Zhang et al. (2016) para conjugados de metoxi-polietilenoglicol-DOX/CUR, respectivamente.

Gao et al. (2017) sintetizaram conjugados de alginato-DOX via reação de formação de base de *Schiff* e encapsularam a curcumina. O percentual de curcumina utilizado foi 10% (m/m) e os valores de ECF de CUR (44,6 ± 1,22%) e CF de CUR (4,2 ± 0,2%) obtidos foram próximos aos alcançados no presente estudo para as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR1, apesar dos conjugados alginato-DOX apresentarem maiores valores de CF de DOX (21,14 ± 0,87%).

Zhang et al. (2016) conjugaram doxorubicina em metoxi-polietilenoglicol via reação de formação de base de *Schiff* e realizaram a incorporação da curcumina. Foram alcançados valores de ECF de CUR (91%) e CF de CUR (18,2%) maiores que os obtidos para as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2, ao utilizar 20% (m/m) de curcumina na preparação das nanopartículas. As nanopartículas PEG-DOX

possuíam valor maior de CF de DOX (18,7%) que as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2, o que pode ter proporcionado uma maior interação da curcumina e conseqüentemente maior percentual de CUR incorporada.

### 5.12.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR1 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 apresentaram diâmetros médios de 60 – 80 nm e distribuição homogênea de tamanho (IPD < 0,4) (Tabela 15), em PBS 7,4 a 37 °C.

Tabela 15 – Valores de diâmetro médio e IPD para as nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm)*	IPD*
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX2	85 ± 5 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR1	79 ± 1 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> -DOX/CUR2	61 ± 3 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,04 <sup>b</sup>

\*Medidos por DLS em PBS 7,4 a 37 °C, após aquecimento de 10 min.

Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Fonte: dados da pesquisa.

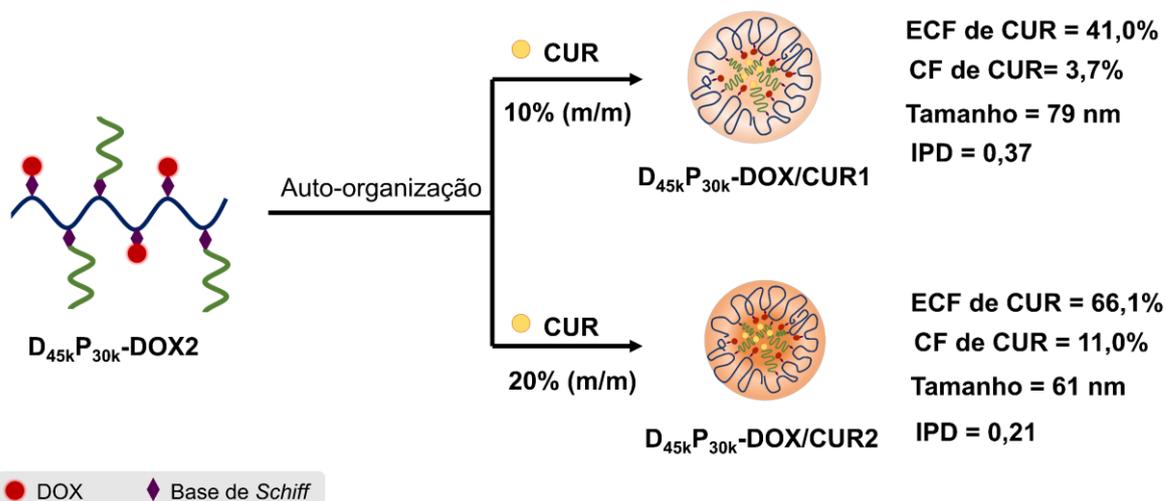
O aumento da carga de fármaco nas nanopartículas proporcionou a formação de núcleos mais compactos devido ao aumento das interações entre as porções hidrofóbicas. Os valores de tamanho das nanopartículas do presente trabalho foram menores que os obtidos para nanopartículas à base de alginato (177,6 ± 3,2 nm) (GAO et al., 2017) e metoxi-polietilenoglicol (183,5 ± 4,5 nm) (Zhang et al., 2016) carregadas com DOX/CUR.

As nanopartículas apresentaram tamanhos apropriados para administração intravenosa (30–300 nm) e para um direcionamento passivo (< 200 nm) em ambiente tumoral via efeito EPR.

Na Figura 45, tem-se uma representação das nanopartículas co-incorporadas com DOX/CUR e suas principais características. Em comparação com as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR1, as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 mostraram capacidade de transportar maior quantidade de agentes terapêuticos, além de exibirem menores valores de tamanho de partícula e IPD, características que poderão facilitar o acúmulo em tecidos tumorais, internalização nas células cancerosas e melhorar a eficácia terapêutica. Portanto, as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-

DOX/CUR2 foram selecionadas para dar continuidade à caracterização morfológica e os estudos *in vitro*.

Figura 46 – Esquema geral das nanopartículas copolímero-DOX/CUR preparadas e suas principais características

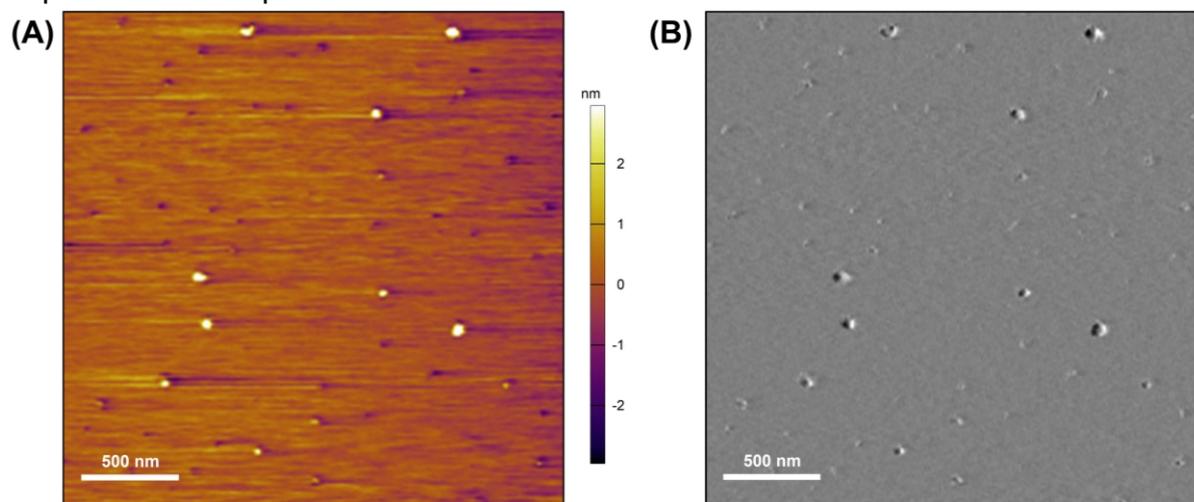


Fonte: elaborada pela autora.

#### 5.12.4 Microscopia de força atômica (MFA)

As nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 foram caracterizadas quanto à morfologia e tamanho por MFA (Figura 47).

Figura 47 – Imagens de microscopia de força atômica (A) de altura e (B) de amplitude da nanopartícula  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2



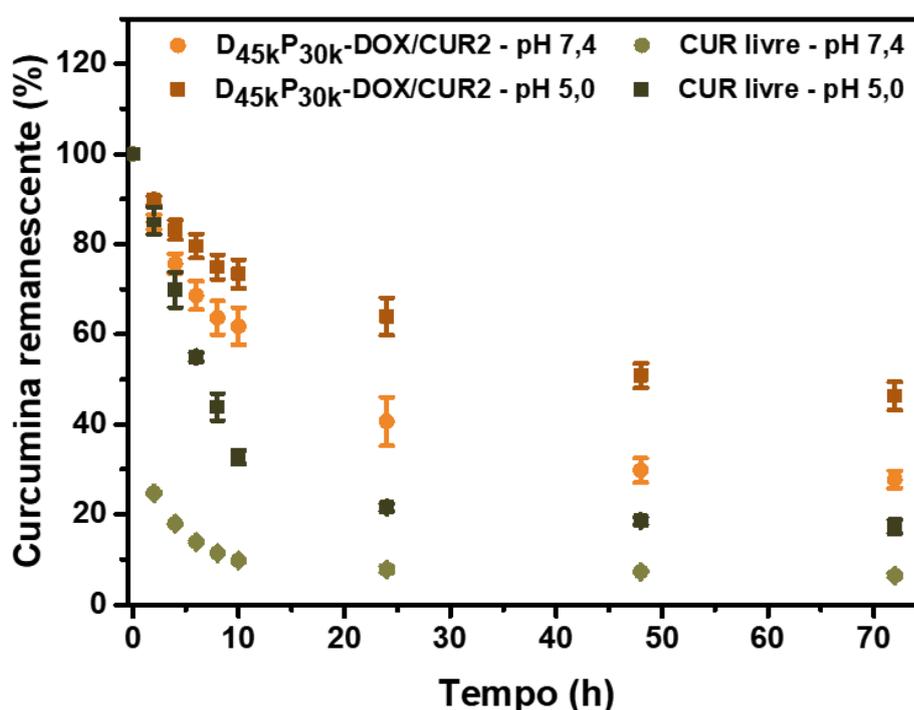
Fonte: dados da pesquisa.

As micrografias mostraram que as nanopartículas são esféricas, com tamanho médio de 34 nm. O valor de tamanho obtido por MFA foi menor que o fornecido por DLS. A variação de tamanho observada entre as medidas de DLS e AFM deve-se à diferença nas condições do processamento.

### 5.12.5 Estabilidade química da curcumina nas nanopartículas

A estabilidade química da curcumina livre e incorporada nas nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 foi investigada em PBS 7,4 e 5,0 a 37 °C através da verificação da mudança do valor da absorbância da curcumina no decorrer do tempo (Figura 48).

Figura 48 – Estabilidade química da curcumina livre e incorporada nas nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 em PBS 7,4 e 5,0 a 37 °C



Fonte: dados da pesquisa.

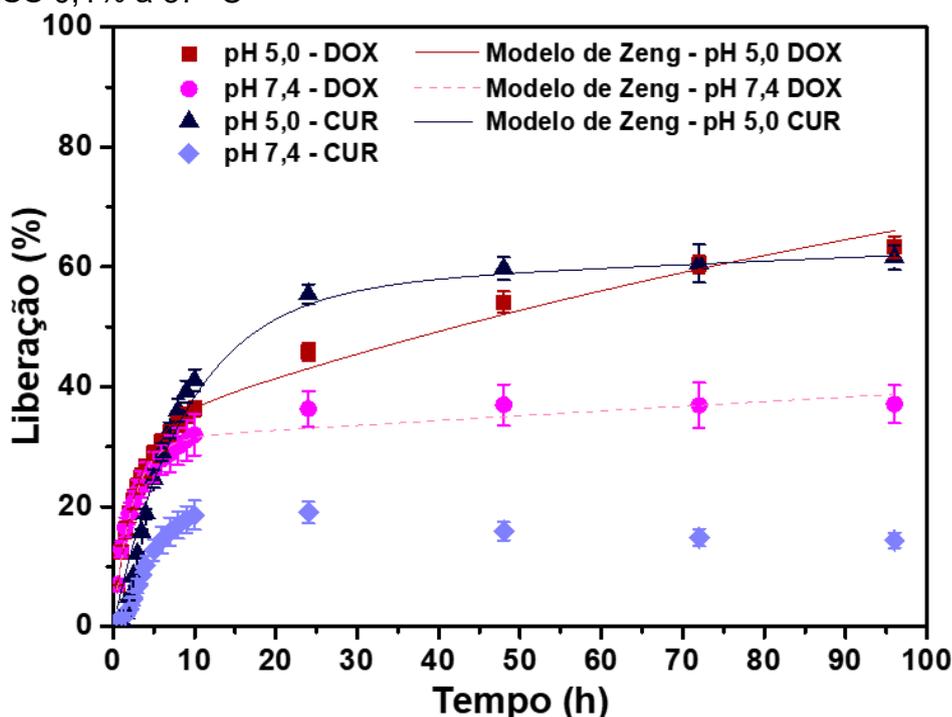
No experimento com a CUR livre em PBS 5,0, observou-se que em 2 h aproximadamente 15% de curcumina havia sido degradada. Enquanto, em PBS 7,4 o percentual de curcumina degradada foi bem expressivo, em torno de 75%. Esse comportamento ocorre, pois a curcumina em meio aquoso pode sofrer degradação oxidativa e hidrolítica, e esses processos ocorrem mais rápido em pH > 7,0 (Nelson et al., 2017; Zheng; Mcclements, 2020). A instabilidade química é uma das

causas da baixa biodisponibilidade da curcumina. A quantidade de curcumina remanescente nas nanopartículas (PBS 5,0 = 46%; PBS 7,4 = 28% após 72 h) em ambos os pHs foi maior que para a CUR livre (PBS 5,0 = 17%; PBS 7,4 = 7% após 72 h), indicativo de que as nanopartículas podem promover uma proteção da curcumina desses processos de degradação.

### 5.12.6 Estudo de liberação *in vitro* da doxorrubicina e curcumina

O estudo de liberação *in vitro* de DOX e CUR das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 foi realizado em PBS 7,4 e 5,0 (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo LSS a 0,1% a 37 °C (Figura 49). Em meio ácido, o percentual de liberação de DOX (63 ± 2%), após 96 h, foi maior que em PBS 7,4 (37 ± 3%). As ligações iminas são sensíveis ao pH do meio e em condições ácidas são facilmente clivadas podendo liberar um maior percentual de fármaco. A ruptura das ligações iminas pode promover a liberação da DOX e a clivagem das cadeias de PNIPAM-NH<sub>2</sub> que compõem as nanopartículas, o que pode também ter proporcionado a maior liberação de CUR (PBS 5,0 = 61 ± 2% e PBS 7,4 = 14 ± 1% após 96 h), em condições ácidas.

Figura 49 – Perfil de liberação *in vitro* da DOX e da CUR das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 em PBS 7,4 e 5,0 contendo LSS 0,1% a 37 °C



Fonte: dados da pesquisa.

Em pH 7,4, foi observado uma redução do percentual de liberação de CUR após 10 h de estudo. Em pH fisiológico, a degradação da curcumina é mais rápida levando à redução da concentração de CUR no meio de liberação. Este comportamento também foi observado por Subtaweesin et al. (2018) para filmes de celulose bacteriana carregado com curcumina e justificado pela degradação da curcumina em pH > 7,0.

Esses resultados sugerem que as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 podem ser um promissor nanossistema de co-liberação de fármacos para a terapia anticâncer, visto a possibilidade de uma liberação pH-responsiva dos agentes terapêuticos em células cancerosas.

A cinética de liberação de DOX e CUR das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 foi estudada utilizando o modelo cinético de Zeng e os parâmetros cinéticos  $k_s$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  e  $\Delta G$  estão mostrados na Tabela 16. O modelo cinético não foi aplicado para a liberação de CUR em pH 7,4, pois após 10 h de estudo ocorreu uma redução do percentual de CUR liberado, o que leva a valores de constantes de velocidade negativos.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos da liberação de DOX e CUR das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2

Nanopartículas	Fármaco	pH	Parâmetros				R <sup>2</sup>
			$k_s$	$k_{on}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{off}$	$\Delta G$ (10 <sup>-21</sup> J)	
D <sub>45k</sub> P <sub>30k</sub> - DOX/CUR2	DOX	7,4	0,4307	0,0027	0,0012	-3,50	0,9714
		5,0	0,3804	0,0150	0,0072	-3,10	0,9918
	CUR	7,4	-	-	-	-	-
		5,0	0,1110	0,0011	0,0015	1,30	0,9709

Fonte: dados da pesquisa.

Foram observados valores de  $k_s \gg k_{on}$  e  $k_s \gg k_{off}$ , indicando que o mecanismo de liberação da DOX e CUR das nanopartículas ocorre inicialmente com uma liberação rápida dos fármacos livres por meio de difusão, seguido de uma liberação lenta do fármaco ligado por meio do processo de dissociação. O valor de  $\Delta G$  em pH 5,0 foi maior que em pH 7,4 para a liberação de DOX, indicando o enfraquecimento da interação fármaco-carreador, o que corrobora com o maior

percentual de liberação de DOX nesse pH. Ao comparar os valores de  $\Delta G$  para liberação de DOX e CUR em pH 5,0 observou-se valor de  $\Delta G$  bem maior para a liberação de CUR. Isto indica que as interações CUR-nanopartícula (interação não-covalente) são mais fracas que as interações DOX-nanopartícula (base de *Schiff*), confirmando o maior percentual de CUR liberado na fase inicial do processo de liberação em meio ácido. Além disso, foram observados valores de  $k_{off}$  maiores em pH 5,0 o que se deve à clivagem da base de *Schiff* ser favorecida em condições ácidas, aumentando a liberação de ambos os agentes terapêuticos das nanopartículas.

### **5.12.7 Ensaio de citotoxicidade**

A fotocitotoxicidade *in vitro* da DOX livre, CUR livre, mistura DOX/CUR livre e das nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 em células HCT-116 e L929 foi avaliada com e sem a exposição à luz azul por 5 min, através do ensaio de MTT após 72 h de incubação (Tabela 17, Tabela 18, APÊNDICE G, APÊNDICE H e APÊNDICE I).

As nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub> apresentaram  $CI_{50} > 500 \mu g mL^{-1}$  nas células estudadas. Enquanto as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 e D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 se mostraram citotóxicas frente às linhagens testadas. Embora as nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR tenham apresentado citotoxicidade contra as células L929, os valores de  $CI_{50}$  foram menores que os observados para a linhagem HCT-116, ou seja, as nanopartículas apresentaram maior citotoxicidade à linhagem cancerosa em comparação à linhagem não-tumoral. Esse comportamento foi observado tanto no experimento sem exposição à luz azul quanto mediante exposição por 5 min.

A terapia fotodinâmica (TFD) mediada pela curcumina promoveu uma redução da  $CI_{50}$  quando as células foram expostas à luz azul por 5 min, após 6 h de incubação com CUR livre ou com a nanopartícula D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2, indicando que a terapia fotodinâmica melhora a atividade citotóxica da curcumina.

Tabela 17 – Valores de  $CI_{50}$  da DOX livre, CUR livre e mistura DOX/CUR livre em células L929 e HCT-116 sem e com TFD, pelo ensaio MTT após 72 h de incubação

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
	L929		L929 + TFD		HCT-116		HCT-116 + TFD	
	DOX	CUR	DOX	CUR	DOX	CUR	DOX	CUR
<b>DOX livre</b>	0,27 (0,24 – 0,30)	–	0,26 (0,21 – 0,31)	–	0,12 (0,07 – 0,15)	–	0,25 (0,19 – 0,31)	–
<b>CUR livre</b>	–	7,5 (6,8 – 8,4)	–	2,8 (2,56 – 3,13)	–	2,40 (1,9 – 2,9)	–	0,57 (0,53 – 0,61)
<b>DOX/CUR livre</b>	0,36 (0,32 – 0,40)	0,30 (0,26 – 0,34)	0,51 (0,41 – 0,64)	0,43 (0,34 – 0,54)	0,12 (0,1 – 0,14)	0,10 (0,08 – 0,12)	0,19 (0,15 – 0,24)	0,16 (0,13 – 0,20)

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 18 – Valores de  $CI_{50}$  das nanopartículas  $D_{45kP_{30k}}$ -DOX2 e  $D_{45kP_{30k}}$ -DOX/CUR2 em células L929 e HCT-116 sem e com TFD, pelo ensaio MTT após 72 h de incubação

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
	L929		L929 + TFD		HCT-116		HCT-116 + TFD	
	DOX	CUR	DOX	CUR	DOX	CUR	DOX	CUR
<b><math>D_{45kP_{30k}}</math>-DOX2</b>	5,22 (4,35 – 6,35)	–	3,75 (3,01 – 4,81)	–	1,67 (1,47 – 2,17)	–	2,20 (1,71 – 2,86)	–
<b><math>D_{45kP_{30k}}</math>-DOX/CUR2</b>	4,16 (3,53 – 4,96)	3,63 (3,08 – 4,32)	2,00 (1,52 – 2,57)	1,73 (1,33 – 2,24)	1,62 (1,41 – 1,84)	1,41 (1,23 – 1,61)	1,10 (0,91 – 1,30)	0,96 (0,80 – 1,14)

Fonte: dados da pesquisa.

Além disso, com a TFD, as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 (CI<sub>50</sub> = 1,10 µg mL<sup>-1</sup>, em HCT-116) causaram maior citotoxicidade em comparação com as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 (CI<sub>50</sub> = 2,20 µg mL<sup>-1</sup>, em HCT-116). Esses resultados sugerem que a combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica em formulação nanoparticulada pode alcançar melhor atividade citotóxica que a nanopartícula com tratamento individual.

Zhang et al. (2022) e Rajiu et al. (2015) avaliaram o efeito da combinação da quimioterapia e da terapia fotodinâmica no tratamento de células de mama (MCF-7) e câncer de fígado humano (HepG2), respectivamente, utilizando nanopartículas incorporadas com CUR e DOX/CUR. Os estudos demonstraram que a combinação das terapias promoveu o aumento da citotoxicidade nas células estudadas por meio da geração fotoinduzida de radicais livres e o tratamento com as nanopartículas DOX/CUR + TFD exibiu maior citotoxicidade que as nanopartículas apenas com CUR + TFD.

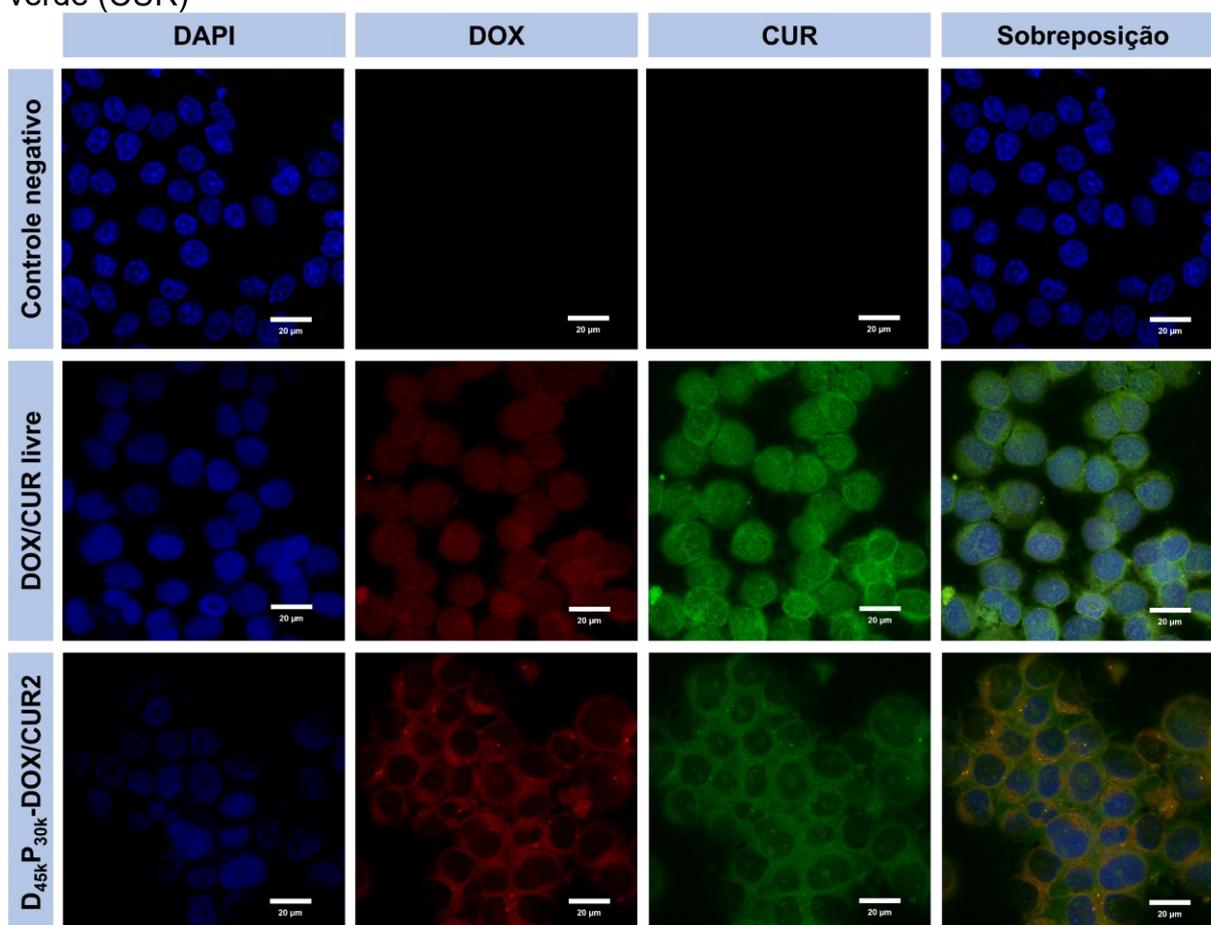
Para a mistura DOX/CUR livre foram observados valores de CI<sub>50</sub> maiores (L929) ou estatisticamente iguais (HCT-116) quando comparado com a DOX livre. Lin et al. (2018) observaram que a combinação DOX/CUR livre bloqueou o efeito citotóxico da DOX em células L929 e MCF-7/ADR. Para os autores, este comportamento provavelmente aconteceu devido a uma afinidade competitiva entre a CUR e a DOX pelos canais de transporte na superfície da membrana plasmática causando a redução da internalização celular de DOX.

Os valores de CI<sub>50</sub> para as nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR foram maiores que dos agentes terapêuticos livres, possivelmente devido à cinética de liberação lenta e à lenta internalização nas células (Sagnella et al., 2014; Li et al., 2016; Zhang et al., 2020). Vale destacar que as nanopartículas apresentaram características vantajosas em relação aos fármacos livres, como tamanhos adequados para o acúmulo passivo nos tecidos tumorais via EPR, proteção da CUR de processos hidrolíticos e oxidativos, além de liberação controlada sensível ao pH do meio.

### 5.12.8 Ensaio de captação celular

A captação celular da mistura DOX/CUR livre e das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 foi investigada qualitativamente em células HCT-116 por microscopia confocal de varredura a laser, baseada na fluorescência intrínseca da DOX (vermelha) e da CUR (verde). Como observado na Figura 50, a mistura DOX/CUR e as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 estavam localizadas no citoplasma e no núcleo. As nanopartículas apresentaram maior distribuição no citoplasma.

Figura 50 – Captação celular da DOX/CUR livre e das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 após incubação com células HCT-116 por 24 h observadas por microscopia confocal de varredura a laser. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul), a fluorescência vermelha representa a DOX e a verde representa a CUR. Fluorescência amarela representa a mistura das cores vermelha (DOX) e verde (CUR)



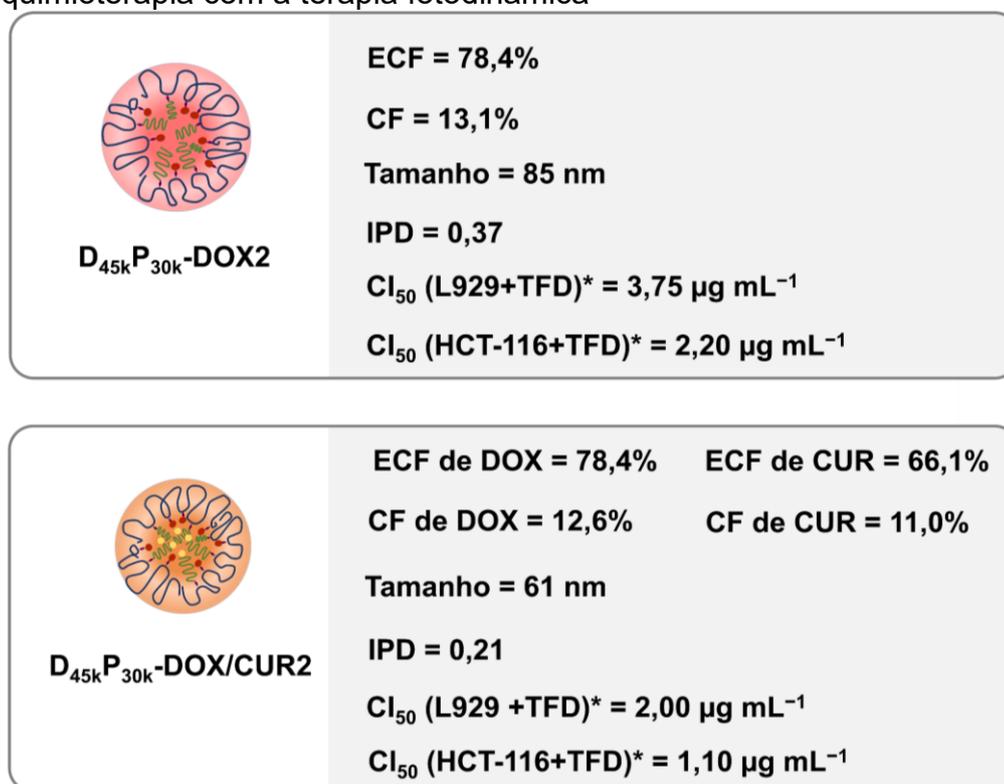
Fonte: dados da pesquisa.

Moléculas pequenas, como fármacos, podem penetrar na membrana plasmática e nuclear por difusão passiva, enquanto nanopartículas carregadas com fármacos é conhecido serem internalizadas por via endocítica. Os diferentes perfis de captação celular da mistura DOX/CUR e das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 pode ser atribuído às diferentes vias de internalização e à lenta liberação dos agentes terapêuticos das nanopartículas (Zhang et al., 2016; Gao et al., 2017). Estes resultados confirmam que as nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 foram capturadas pelas células cancerosas HCT-116, garantindo a liberação intracelular da DOX e da CUR.

### 5.13 Resumo geral das nanopartículas copolímero-DOX e copolímero DOX/CUR

Na Figura 51, pode-se observar os principais resultados das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 que foram testadas na combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica.

Figura 51 – Comparação dos resultados das nanopartículas  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX2 e  $D_{45k}P_{30k}$ -DOX/CUR2 que foram testadas na combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica



\*Concentração de DOX

Fonte: elaborada pela autora.

O presente trabalho teve enfoque na preparação, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de novos nanocarreadores capazes de incorporar dois agentes terapêuticos com potencial aplicação na terapia combinada (quimioterapia e terapia fotodinâmica) contra o câncer. Notavelmente, as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 apresentaram alta ECF e CF, além de características vantajosas em relação aos agentes terapêuticos livres (DOX e CUR), como tamanhos adequados para o acúmulo passivo nos tecidos tumorais via EPR, proteção da CUR de processos hidrolíticos e oxidativos, bem como liberação controlada sensível ao pH do meio. Além disso, a combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica em nanosistemas promoveu melhor atividade anticâncer em comparação às nanopartículas com tratamento individual.

Apesar da pesquisa não ter focado no aprofundamento das análises biológicas, reconhecemos a importância da realização de ensaios para quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular, análises de ciclo celular e apoptose em estudos futuros para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de morte celular. Além disso, são necessários estudos *in vivo* em modelos animais para compreender a biodistribuição das nanopartículas e avaliar os efeitos delas no organismo, incluindo nos tecidos tumorais e saudáveis.

## 6 CONCLUSÃO

Copolímeros por enxertia termo- e pH-responsivos foram sintetizados via reação de formação de base de *Schiff* entre o grupo amino terminal do PNIPAM-NH<sub>2</sub> e os grupos aldeído da dextrana oxidada, com diferentes massas molares. Os copolímeros foram capazes de se auto-organizar em nanopartículas após estímulo térmico. A integridade das nanopartículas foi mantida em pH 7,4, enquanto em pH 5,0 ocorreu o intumescimento e separação das bandas de distribuição de tamanho devido à clivagem das ligações imina, o que confirma a propriedade pH-responsiva dos copolímeros. A doxorrubicina foi conjugada aos copolímeros via reação de formação de base de *Schiff* e a curcumina foi co-incorporada por interação não covalente. Nanopartículas com tamanhos apropriados para aplicação intravenosa e para promover o acúmulo do medicamento em tecidos tumorais via efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) foram obtidas. As nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR mostram perfil de liberação dependente do pH do meio, uma vez que as ligações iminas são clivadas em condições ácidas. Os testes de estabilidade química da curcumina mostraram que as nanopartículas promoveram uma proteção da curcumina dos processos de degradação. Além disso, as nanopartículas carregadas com DOX e DOX/CUR mostraram citotoxicidade em células HCT-116. A combinação da quimioterapia com a terapia fotodinâmica em nanosistemas promoveu uma melhor atividade citotóxica nas células HCT-116 em comparação à monoterapia. Portanto, as nanopartículas D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 exibiram potencial como sistema inteligente para terapia combinada contra o câncer.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. M. W. S.; PAULA, H. C. B.; SEABRA, V.; et al. Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 77, 2016.
- AGHAJANZADEH, M.; ZAMANI, M.; KOUCHI, F. R.; et al. Synergic antitumor effect of photodynamic therapy and chemotherapy mediated by nano drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 322, 2022.
- AGUILAR, M. R.; ROMÁN, J. S. Introduction to smart polymers and their applications. In: M. R. Aguilar; J. S. Román; **Smart Polymers and their Applications**. 1 ed., Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. p. 568.
- AILIOAIE, L. M.; AILIOAIE, C.; LITSCHER, G. Latest innovations and nanotechnologies with curcumin as a nature-inspired photosensitizer applied in the photodynamic therapy of cancer. **Pharmaceutics**, v. 13, p. 1562, 2021.
- ALAVI, M.; WEBSTER, T. J. Recent progress and challenges for polymeric microsphere compared to nanosphere drug release systems: is there a real difference? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 116028, 2021.
- ALEXANDRIDIS, P. Amphiphilic copolymers and their applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, p. 490–501, 1996.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 01–10, 2012.
- ANAND, U.; DEY, A.; CHANDEL, A. K. S.; et al. Cancer chemotherapy and beyond: current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes and Diseases**, v. 10, p. 1367–1401, 2023.
- ANASTASE-RAVION, S.; DING, Z.; PELLÉ, A.; HOFFMAN, A. S.; LETOURNEUR, D. New antibody purification procedure using a thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide)-dextran derivative conjugate. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 761, p. 247–254, 2001.
- ANSARI, M. J.; RAJENDRAN, R. R.; MOHANTO, S.; et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels for biomedical applications: a review of the state-of-the-art. **Gels**, v. 8, p. 454, 2022.
- ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; HASHEMI, F.; et al. Polychemotherapy with curcumin and doxorubicin via biological nanoplateforms: Enhancing antitumor activity. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 1084, 2020.

ATANASE, L. I.; DESBRIERES, J.; RIESS, G. Micellization of synthetic and polysaccharides-based graft copolymers in aqueous media. **Progress in Polymer Science**, v. 73, p. 32–60, 2017.

ATTIA, M. F.; ANTON, N.; WALLYN, J.; OMRAN, Z.; VANDAMME, T. F. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, p. 1185–1198, 2019.

AZIZ, B.; AZIZ, I.; KHURSHID, A.; et al. An overview of potential natural photosensitizers in cancer photodynamic therapy. **Biomedicines**, v. 11, p. 224, 2023.

BABELYTE, M.; PECIULYTE, L.; NAVIKAITE-SNIPAITIENE, V.; et al. Synthesis and characterization of thermoresponsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers. **Polymers**, v. 15, p. 3154, 2023.

BALAKRISHNAN, B.; LESIEUR, S.; LABARRE, D.; JAYAKRISHNAN, A. Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture: a comparative study. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1425–1429, 2005.

BELLONE, M.; CALCINOTTO, A.; FILIPAZZI, P.; et al. The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. **Oncolmunology**, v. 2, p. e22058, 2013.

BENJANUWATTRA, J.; SIRI-ANGKUL, N.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Doxorubicin and its proarrhythmic effects: a comprehensive review of the evidence from experimental and clinical studies. **Pharmacological Research**, v. 151, p. 104542, 2020.

BLANCO-FERNANDEZ, B.; CONCHEIRO, A.; MAKWANA, H.; et al. Dually sensitive dextran-based micelles for methotrexate delivery. **RSC Advances**, v. 7, p. 14448–14460, 2017.

BOCCCELLINO, M.; AMBROSIO, P.; BALLINI, A.; et al. The role of curcumin in prostate cancer cells and derived spheroids. **Cancers**, v. 14, p. 3348, 2022.

BOKIAS, G.; MYLONAS, Y.; STAIKOS, G.; BUMBU, G. G.; VASILE, C. Synthesis and aqueous solution properties of novel thermoresponsive graft copolymers based on a carboxymethylcellulose backbone. **Macromolecules**, v. 34, p. 4958–4964, 2001.

BORDALLO, E.; RIEUMONT, J.; TIERA, M. J.; GÓMEZ, M.; LAZZARI, M. Self-assembly in aqueous solution of amphiphilic graft copolymers from oxidized carboxymethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 43–49, 2015.

BORDAT, A.; BOISSENOT, T.; NICOLAS, J.; TSAPIS, N. Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 138, p. 167–192, 2019.

CAGEL, M.; GROTZ, E.; BERNABEU, E.; MORETTON, M. A.; CHIAPPETTA, D. A. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 270–281, 2017.

CAMBÓN, A.; REY-RICO, A.; BARBOSA, S.; et al. Poly(styrene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers: from “classical” chemotherapeutic nanocarriers to active cell-response inducers. **Journal of Controlled Release**, v. 167, p. 68–75, 2013.

CHANG, D.; MA, Y.; XU, X.; XIE, J.; JU, S. Stimuli-responsive polymeric nanoplatfoms for cancer therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 707319, 2021.

CHEN, F.; HUANG, G.; HUANG, H. Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 827–834, 2020.

CHEN, K.; CAI, H.; ZHANG, H.; et al. Stimuli-responsive polymer-doxorubicin conjugate: antitumor mechanism and potential as nano-prodrug. **Acta Biomaterialia**, v. 84, p. 339–355, 2019.

CHEN, X.; HUANG, Y.; ZHANG, H.; GAUTHIER, M.; YANG, G. Intelligent Responsive Copolymers Based on Cellulose Structure, Properties, and Applications. In: V. K. Thakur; **Cellulose-Based Graft Copolymers Structure and Chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015. p.597.

CHERNYKH, M.; ZAVALNY, D.; SOKOLOVA, V.; et al. A new water-soluble thermosensitive star-like copolymer as a promising carrier of the chemotherapeutic drug doxorubicin. **Materials**, v. 14, p. 3517, 2021.

CHUMACHENKO, V.; KUTSEVOL, N.; HARA HUTS, Y.; et al. Star-like dextran-graft-pnipam copolymers. Effect of internal molecular structure on the phase transition. **Journal of Molecular Liquids**, v. 235, p. 77–82, 2017.

CONSTANTIN, M.; BUCĂTARIU, S.; STOICA, I.; FUNDUEANU, G. Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(N-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 698–708, 2017.

CORREIA, J. H.; RODRIGUES, J. A.; PIMENTA, S.; DONG, T.; YANG, Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, v. 13, p. 1332, 2021.

CURCIO, M.; CIRILLO, G.; PAOLÌ, A.; et al. Self-assembling dextran prodrug for redox- and pH-responsive co-delivery of therapeutics in cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, p. 110537, 2020.

DAI, W.; WANG, XIAOYOU; SONG, G.; et al. Combination antitumor therapy with targeted dual-nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 115, p. 23–45, 2017.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 57, 2018.

DEBELA, D. T.; MUZAZU, S. G. Y.; HERARO, K. D.; et al. New approaches and procedures for cancer treatment: current perspectives. **SAGE Open Medicine**, v. 9, p. 1–10, 2021.

DENG, Y.; VERRON, E.; ROHANIZADEH, R. Molecular mechanisms of anti-metastatic activity of curcumin. **Anticancer Research**, v. 36, p. 5639–5647, 2016.

DEY, S.; SREENIVASAN, K. Conjugating curcumin to water soluble polymer stabilized gold nanoparticles via pH responsive succinate linker. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 824–833, 2015.

DIZAJ, S. M.; ALIPOUR, M.; ABDOLAHINIA, E. D.; et al. Curcumin nanoformulations: beneficial nanomedicine against cancer. **Phytotherapy Research**, v. 36, p. 1156–1181, 2022.

DONG, P.; LV, H.; JIA, W.; et al. Polysaccharide dextran-based conjugate for selective co-delivery of two synergistic drugs docetaxel and docosahexaenoic acid to tumor cells. **Drug Delivery**, v. 30, p. 40–50, 2023.

FABIANOWSKA-MAJEWSKA, K.; KAUFMAN-SZYMCHYK, A.; SZYMANSKA-KOLBA, A.; et al. Curcumin from turmeric rhizome: a potential modulator of dna methylation machinery in breast cancer inhibition. **Nutrients**, v. 13, p. 332, 2021.

FAN, B.; TORRES GARCÍA, D.; SALEHI, M.; et al. Dynamic covalent dextran hydrogels as injectable, self-adjuvating peptide vaccine depots. **ACS Chemical Biology**, v. 18, p. 652–659, 2023.

FENG, S. S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 4087–4114, 2003.

FENG, X.; LI, D.; HAN, J.; ZHUANG, X.; DING, J. Schiff base bond-linked polysaccharide–doxorubicin conjugate for upregulated cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 1121–1128, 2017.

FERLAY, L.; LAVERSANNE, M.; ERVIK, M.; et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Acesso em 25 fevereiro 2024.

FERRARI, R.; SPONCHIONI, M.; MORBIDELLI, M.; MOSCATELLI, D. Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: the checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation. **Nanoscale**, v. 10, p. 22701–22719, 2018.

FLYNN, J.; CULEBRAS, M.; COLLINS, M. N.; HUDSON, S. P. The impact of varying dextran oxidation levels on the inhibitory activity of a bacteriocin loaded injectable hydrogel. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 13, p. 308–319, 2023.

FREI, E.; KARON, M.; LEVIN, R. H.; et al. The Effectiveness of Combinations of Antileukemic Agents in Inducing and Maintaining Remission in Children with Acute Leukemia. **Blood**, v. 26, p. 642–656, 1965.

GAO, C.; TANG, F.; GONG, G.; et al. pH-responsive prodrug nanoparticles based on a sodium alginate derivative for selective co-release of doxorubicin and curcumin into tumor cells. **Nanoscale**, v. 9, p. 12533–12542, 2017.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 787–809, 2008.

GOMES, R. F.; LIMA, L. R. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. DE. Influence of galactomannan molar mass on particle size galactomannan-grafted-poly-N-isopropylacrylamide copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 446–453, 2020.

GOMEZ, C. G.; RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 296–304, 2007.

GREBINYK, A.; PRYLUTSKA, S.; GREBINYK, S.; et al. Drug delivery with a pH-sensitive star-like dextran-graft polyacrylamide copolymer. **Nanoscale Advances**, v. 4, p. 5077–5088, 2022.

GRIN, M.; SUVOROV, N.; OSTROVERKHOV, P.; et al. Advantages of combined photodynamic therapy in the treatment of oncological diseases. **Biophysical Reviews**, v. 14, p. 941–963, 2022.

GUNAYDIN, G.; GEDIK, M. E.; AYAN, S. Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer—A review of the current clinical status. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 686303, 2021.

GUPTA, N. R.; GHUTE, P. P.; BADIGER, M. V. Synthesis and characterization of thermo-sensitive graft copolymer of carboxymethyl guar and poly(N - isopropylacrylamide). **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 74–80, 2011.

HENRÍQUEZ, C.; BUENO, C.; LISSI, E. A.; ENCINAS, M. V. Thiols as chain transfer agents in free radical polymerization in aqueous solution. **Polymer**, v. 44, p. 5559–5561, 2003.

HESKINS, M.; GUILLET, J. E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). **Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry**, v. 2, p. 1441–1455, 1968.

HUANG, D.; ZHOU, Y.; XIANG, Y.; et al. Polyurethane/doxorubicin nanoparticles based on electrostatic interactions as pH-sensitive drug delivery carriers. **Polymer International**, v. 67, p. 1186–1193, 2018.

HUANG, SHANGHUI; LIU, H.; HUANG, SHAOSHAN; et al. Dextran methacrylate hydrogel microneedles loaded with doxorubicin and trametinib for continuous transdermal administration of melanoma. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, p. 116650, 2020.

HUANG, Y.; YONG, P.; CHEN, Y.; et al. Micellization and gelatinization in aqueous media of pH- and thermo-responsive amphiphilic ABC (PMMA82-b-PDMAEMA150- b -PNIPAM65) triblock copolymer synthesized by consecutive RAFT polymerization. **RSC Advances**, v. 7, p. 28711–28722, 2017.

HUH, K. M.; HASHI, J.; OOYA, T.; YUI, N. Synthesis and characterization of dextran grafted with poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide). **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 201, p. 613–619, 2000.

INCA, I. N. DE C. J. A. G. DA S. **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. 2022.

IONIȚĂ, S.; LINCUI, D.; MITRAN, R. A.; et al. Resveratrol encapsulation and release from pristine and functionalized mesoporous silica carriers. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 203, 2022.

ISE, T.; NAGAOKA, K.; OSA, M.; YOSHIZAKI, T. Cloud points in aqueous solutions of poly(N-isopropylacrylamide) synthesized by aqueous redox polymerization. **Polymer Journal**, v. 43, p. 164–170, 2011.

JAROSZ, T.; GEBKA, K.; STOLARCZYK, A. Recent advances in conjugated graft copolymers: approaches and applications. **Molecules**, v. 24, p. 3019, 2019.

JIA, Y.; LI, J. Molecular assembly of Schiff base interactions: Construction and application. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1597–1621, 2015.

JIJO, V. J.; SHARMA, K. P.; MATHEW, R.; et al. Volume transition of PNIPAM in a nonionic surfactant hexagonal mesophase. **Macromolecules**, v. 43, p. 4782–4790, 2010.

KAH, G.; CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. Curcumin a natural phenol and its therapeutic role in cancer and photodynamic therapy: a review. **Pharmaceutics**, v. 15, p. 639, 2023.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 2039–2044, 1977.

KAMAL, N.; ILOWEFAH, M. A.; HILLES, A. R.; et al. Genesis and mechanism of some cancer types and an overview on the role of diet and nutrition in cancer prevention. **Molecules**, v. 27, p. 1794, 2022.

KAMIŃSKA, K.; CUDNOCH-JĘDRZEJEWSKA, A. A Review on the neurotoxic effects of doxorubicin. **Neurotoxicity Research**, 2023.

KELLY, J. F.; SNELL, M. E. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. **Journal of Urology**, v. 115, p. 150–151, 1976.

KHIMANI, M.; YUSA, S. ICHI; ASWAL, V. K.; BAHADUR, P. Aggregation behavior of double hydrophilic block copolymers in aqueous media. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 47–56, 2019.

KHODABAKHSHIAN, R.; BAYATI, M. R.; EMADI, B. An evaluation of IR spectroscopy for authentication of adulterated turmeric powder using pattern recognition. **Food Chemistry**, v. 364, p. 130406, 2021.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, p. 598–613, 2018.

KIM, D. J.; HEO, J. YOUNG; KIM, K. S.; CHOI, I. S. Formation of thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)/dextran particles by atom transfer radical polymerization. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 24, p. 517–521, 2003.

KJØNIKSEN, A. L.; NYSTRÖM, B.; TENHU, H. Characterisation of thermally controlled chain association in aqueous solutions of poly(N-isopropyl acrylamide)-g-poly(ethylene oxide): dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 228, p. 75–83, 2003.

KOLARIKOVA, M.; HOSIKOVA, B.; DILENKO, H.; et al. Photodynamic therapy: innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments. **Medicinal Research Reviews**, v. 43, p. 717–774, 2023.

KOLEV, T. M.; VELCHEVA, E. A.; STAMBOLIYSKA, B. A.; SPITELLER, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 102, p. 1069–1079, 2005.

KONG, M.; PENG, X.; CUI, H.; et al. pH-responsive polymeric nanoparticles with tunable sizes for targeted drug delivery. **RSC Advances**, v. 10, p. 4860–4868, 2020.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, p. 2930, 2019.

KRISTIANSEN, K. A.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1264–1271, 2010.

KURZHALS, S.; GAL, N.; ZIRBS, R.; REIMHULT, E. Controlled aggregation and cell uptake of thermoresponsive polyoxazoline-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Nanoscale**, v. 9, p. 2793–2805, 2017.

KUTTAN, R.; BHANUMATHY, P.; NIRMALA, K.; GEORGE, M. C. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). **Cancer Letters**, v. 29, p. 197–202, 1985.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYSTUPSKI, D.; et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, 2018.

LEAL, D.; BORGGRAEVE, W. DE; ENCINAS, M. V.; MATSUHIRO, B.; MÜLLER, R. Preparation and characterization of hydrogels based on homopolymeric fractions of sodium alginate and PNIPAAm. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 157–166, 2013.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75–84, 2015.

LENCINA, M. M. S.; IATRIDI, Z.; VILLAR, M. A.; TSITSILIANIS, C. Thermoresponsive hydrogels from alginate-based graft copolymers. **European Polymer Journal**, v. 61, p. 33–44, 2014.

LEWANDOWSKA, A. M.; RUDZKI, M.; RUDZKI, S.; LEWANDOWSKI, T.; LASKOWSKA, B. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, p. 1–7, 2019.

LI, D.; HAN, J.; DING, J.; CHEN, L.; CHEN, X. Acid-sensitive dextran prodrug: a higher molecular weight makes a better efficacy. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 33–41, 2017.

LI, D.; XU, W.; LI, P.; et al. Self-targeted polysaccharide prodrug suppresses orthotopic hepatoma. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, p. 4231–4235, 2016.

LI, X.; LOVELL, J. F.; YOON, J.; CHEN, X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, p. 657–674, 2020.

LIM, Y. Self-assembling peptide nanostructures: towards bioactive artificial protein nanomaterials. In: J. Castillo; L. Sasso; W. E. Svendsen; **Self-assembled peptide nanostructures : advances and applications in nanobiotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p.93–116.

LIMA, L. R. M.; RAMOS, E. L. DE L.; SILVA, M. F. S.; et al. Poly(N-isopropylacrylamide)/galactomannan from *Delonix regia* seed thermal responsive graft copolymer via Schiff base reaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 144–154, 2021.

LIN, S.; XIE, P.; LUO, M.; et al. Efficiency against multidrug resistance by co-delivery of doxorubicin and curcumin with a legumain-sensitive nanocarrier. **Nano Research**, v. 11, p. 3619–3635, 2018.

LISMAN, A.; BUTRUK, B.; WASIAK, I.; CIACH, T. Dextran/Albumin hydrogel sealant for Dacron® vascular prosthesis. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, p. 1386–1396, 2014.

- LÜ, S.; LIU, M.; NI, B. Degradable, injectable poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels with low gelation concentrations for protein delivery application. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, p. 241–250, 2011.
- LUO, C. Q.; XING, L.; CUI, P. F.; et al. Curcumin-coordinated nanoparticles with improved stability for reactive oxygen species-responsive drug delivery in lung cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 855–869, 2017.
- MAIA, J.; CARVALHO, R. A.; COELHO, J. F. J.; SIMÕES, P. N.; GIL, M. H. Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes. **Polymer journal**, v. 52, p. 258–265, 2011.
- MAIA, J.; FERREIRA, L.; CARVALHO, R.; RAMOS, M. A.; GIL, M. H. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. **Polymer**, v. 46, p. 9604–9614, 2005.
- MANGOLIM, C. S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; et al. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, v. 153, p. 361–370, 2014.
- MANOLOVA, Y.; DENEVA, V.; ANTONOV, L.; DRAKALSKA, E.; MOMEKOVA, D. The effect of the water on the curcumin tautomerism : a quantitative approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 815–820, 2014.
- MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A.; AMIN DOUSTVANDI, M.; et al. Photodynamic therapy for cancer: role of natural products. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 395–404, 2019.
- MAROCCO, L.; UMRATH, F.; SACHSENMAIER, S.; et al. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy potentiates the effectiveness of doxorubicin in ewing sarcomas. **Biomedicines**, v. 10, p. 2900, 2022.
- MARQUES, N. DO N.; LIMA, B. L. B. DE; BALABAN, R. DE C. Carboxymethylcellulose grafted to amino-terminated poly(N-isopropylacrylamide): preparation, characterization and evaluation of the thermoassociative behaviour at low concentrations. **Macromolecular Symposia**, v. 367, p. 126–135, 2016.
- MENILLI, L.; MILANI, C.; REDDI, E.; MORET, F. Overview of nanoparticle-based approaches for the combination of photodynamic therapy (PDT) and chemotherapy at the preclinical stage. **Cancers**, v. 14, p. 4462, 2022.
- MO, F.; XIAO, Y.; ZENG, H.; et al. Curcumin-induced global profiling of transcriptomes in small cell lung cancer cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 588299, 2021.
- NAESSENS, M.; CERDOBBEL, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 845–860, 2005.

NELSON, K. M.; DAHLIN, J. L.; BISSON, J.; et al. The essential medicinal chemistry of curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 1620–1637, 2017.

NIRMALA, M. J.; KIZHUVEETIL, U.; JOHNSON, A.; et al. Cancer nanomedicine: a review of nano-therapeutics and challenges ahead. **RSC Advances**, v. 13, n. 13, p. 8606–8629, 2023.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization**. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 839.

OJO, O. A.; ADEYEMO, T. R.; ROTIMI, D.; et al. Anticancer properties of curcumin against colorectal cancer: a review. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 881641, 2022.

OLSZOWY, M.; NOWAK-PERLAK, M.; WOŹNIAK, M. Current strategies in photodynamic therapy (PDT) and photodynamic diagnostics (PDD) and the future potential of nanotechnology in cancer treatment. **Pharmaceutics**, v. 15, p. 1712, 2023.

PALAO-SUAY, R.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; AGUILAR, M. R.; VÁZQUEZ-LASA, B.; SAN ROMÁN, J. Self-assembling polymer systems for advanced treatment of cancer and inflammation. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 207–248, 2016.

PAMIES, R.; ZHU, K.; KJØNIKSEN, A. L.; NYSTRÖM, B. Thermal response of low molecular weight poly-(N-isopropylacrylamide) polymers in aqueous solution. **Polymer Bulletin**, v. 62, p. 487–502, 2009.

PAN, J.; ROSTAMIZADEH, K.; FILIPCZAK, N.; TORCHILIN, V. P. Polymeric co-delivery systems in cancer treatment: an overview on component drugs' dosage ratio effect. **Molecules**, v. 24, p. 1035, 2019.

PASPARAKIS, G.; TSITSILIANIS, C. LCST polymers: thermoresponsive nanostructured assemblies towards bioapplications. **Polymer**, v. 211, p. 123146, 2020.

PASTEUR, L. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. **Bull Soc Chim F**, p. 30–31, 1861.

PATRIZI, M. L.; PIANTANIDA, G.; COLUZZA, C.; MASCI, G. ATRP synthesis and association properties of temperature responsive dextran copolymers grafted with poly(N-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 45, p. 2779–2787, 2009.

PERAM, M. R.; JALALPURE, S. S.; JOSHI, S. A.; PALKAR, M. B.; DIWAN, P. V. Single robust RP-HPLC analytical method for quantification of curcuminoids in commercial turmeric products, Ayurvedic medicines, and nanovesicular systems. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 40, p. 487–498, 2017.

PETROVICI, A. R.; PINTEALA, M.; SIMIONESCU, N. Dextran Formulations as Effective Delivery Systems of Therapeutic Agents. **Molecules**, v. 28, p. 1086, 2023.

PLUCINSKI, A.; LYU, Z.; SCHMIDT, B. V. K. J. Polysaccharide nanoparticles: From fabrication to applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, p. 7030–7062, 2021.

PRASAD, C.; BHATIA, E.; BANERJEE, R. Curcumin encapsulated lecithin nanoemulsions: an oral platform for ultrasound mediated spatiotemporal delivery of curcumin to the tumor. **Scientific Reports**, v. 10, p. 8587, 2020.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, p. 20091–20112, 2014.

PURAMA, R. K.; GOSWAMI, P.; KHAN, A. T.; GOYAL, A. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 30–35, 2009.

QIU, X.; HU, S. “Smart” materials based on cellulose: a review of the preparations, properties, and applications. **Materials**, v. 6, p. 738–781, 2013.

RAI, G.; YADAV, A. K.; JAIN, N. K.; AGRAWAL, G. P. Eudragit-coated dextran microspheres of 5-fluorouracil for site-specific delivery to colon. **Drug Delivery**, v. 23, p. 328–337, 2016.

RAJIU, V.; BALAJI, P.; SHEENA, T. S.; AKBARSHA, M. A.; JEGANATHAN, K. Doxorubicin-anchored curcumin nanoparticles for multimode cancer treatment against human liver carcinoma cells. **Particle and Particle Systems Characterization**, v. 32, p. 1028–1042, 2015.

RAVEENDRAN, R.; BHUVANESHWAR, G. S.; SHARMA, C. P. Hemocompatible curcumin-dextran micelles as pH sensitive pro-drugs for enhanced therapeutic efficacy in cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 497–507, 2016.

RAWAL, S.; PATEL, M. M. Threatening cancer with nanoparticle aided combination oncotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 301, p. 76–109, 2019.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 64–70, 2018.

RODRIGUES, J. L.; PRATHER, K. L. J.; KLUSKENS, L. D.; RODRIGUES, L. R. Heterologous production of curcuminoids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, p. 39–60, 2015.

RODRÍGUEZ, A. G.; CARRAZANA, M. S.; TANTY, C. R.; et al. Smart polymeric micelles for anticancer hydrophobic drugs. **Cancers**, v. 15, p. 1–22, 2023.

ROY, S.; HALDER, M.; RAMPRASAD, P.; et al. Oxidized pullulan exhibits potent antibacterial activity against *S. aureus* by disrupting its membrane integrity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 249, p. 126049, 2023.

RUTZ, J.; MAXEINER, S.; JUENGEL, E.; et al. Growth and proliferation of renal cell carcinoma cells is blocked by low curcumin concentrations combined with visible light irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1464, 2019.

SAGNELLA, S. M.; DUONG, H.; MACMILLAN, A.; et al. Dextran-based doxorubicin nanocarriers with improved tumor penetration. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 262–275, 2014.

SANTOS, A.; SILVA, E. DA; MONTENEGRO, R.; et al. Stable and thermo-responsive dextran sulfate-graft-PNIPAm amphiphilic nanoparticles for potential target methotrexate delivery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 1262-1272, 2023.

SCHEIBLER, C. Investigation on the nature of the gelatinous excretion (so-called frog's spawn) which is observed in production of beet-sugar juices. **Z Dtsch Zucker-Ind**, v. 24, p. 309–335, 1874.

SCHILD, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide ): experiment, theory and application. **Progress in Polymer Science**, v. 17, p. 163–249, 1992.

SEIDI, F.; SALIMI, H.; ARABI, A.; SHABANIAN, M. Synthesis of hybrid materials using graft copolymerization on non-cellulosic polysaccharides via homogenous ATRP. **Progress in Polymer Science**, v. 76, p. 1–39, 2018.

SENAPATI, S.; MAHANTA, A. K.; KUMAR, S.; MAITI, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, p. 1–19, 2018.

SHARIFI-RAD, J.; RAYESS, Y. EL; RIZK, A. A.; et al. Turmeric and its major compound curcumin on health: bioactive effects and safety profiles for food, pharmaceutical, biotechnological and medicinal applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 01021, 2020.

SHI, P.; CHENG, Z.; ZHAO, K.; et al. Active targeting schemes for nano-drug delivery systems in osteosarcoma therapeutics. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 21, p. 103, 2023.

SIDDIQUI, N. N.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S. A. U.; MOLINARO, A. Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 331–338, 2014.

SORDO-BAHAMONDE, C.; LORENZO-HERRERO, S.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. P.; et al. Chemo-immunotherapy: a New trend in cancer treatment. **Cancers**, v. 15, p. 2912, 2023.

SRITHARAN, S.; SIVALINGAM, N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. **Life Sciences**, v. 278, p. 119527, 2021.

STANIC, Z. Curcumin, a compound from natural sources, a true scientific challenge – a review. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 72, p. 1–12, 2017.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 416–427, 2013.

SU, H.; JIA, Q.; SHAN, S. Synthesis and characterization of Schiff base contained dextran microgels in water-in-oil inverse microemulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 156–162, 2016.

SU, H.; ZHANG, W.; WU, Y.; et al. Schiff base-containing dextran nanogel as pH-sensitive drug delivery system of doxorubicin : synthesis and characterization. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 33, p. 170–181, 2018.

SUVOROVA, O. B.; IOZEP, A. A.; PASSET, B. V. Reactivity of polysaccharide aldehydes toward N-nucleophiles. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 74, p. 1016–1020, 2001.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 157–170, 2013.

TAN, S.; ZHAO, D.; YUAN, D.; et al. Influence of indomethacin-loading on the micellization and drug release of thermosensitive dextran-graft-poly(N-isopropylacrylamide). **Reactive and Functional Polymers**, v. 71, p. 820–827, 2011.

TANG, L.; WANG, L.; YANG, X.; et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications. **Progress in Materials Science**, v. 115, p. 100702, 2021.

TIAN, H.; YU, L.; ZHANG, M.; et al. Dextran-doxorubicin prodrug nanoparticles conjugated with CD147 monoclonal antibody for targeted drug delivery in hepatoma therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 228, p. 113400, 2023.

TIEGHEM, P. VAN. On sugar-mill gum. **Ann Sci Nature Bot Biol Veg**, v. 7, p. 180–203, 1878.

TU, Y. L.; WANG, C. C.; CHEN, C. Y. Preparation of shell crosslinked nanoencapsulate for drug carriers by using poly(N-isopropyl acrylamide)-co-poly(L-lysine) grafted copolymer. **Journal of Polymer Research**, v. 25, p. 1–8, 2018.

UROŠEVIC, M.; NIKOLIC, L.; GAJIC, I.; et al. Curcumin: biological activities and modern pharmaceutical forms. **Antibiotics**, v. 11, p. 135, 2022.

VASILE, C.; NITA, L. E. Novel multi-stimuli responsive sodium alginate-grafted-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers: II. Dilute solution properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 77–84, 2011.

WANG, L.-Q.; TU, K.; LI, Y.; et al. Synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly (N-isopropylacrylamide). **Reactive and Functional Polymers**, v. 53, p. 19–27, 2002.

- WANG, S.; YUAN, F.; CHEN, G.; et al. Dextran-based thermo-responsive hemoglobin-polymer conjugates with oxygen-carrying capacity. **RSC Advances**, v. 4, p. 52940–52948, 2014.
- WANG, X.; LI, C.; WANG, Y.; et al. Smart drug delivery systems for precise cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, p. 4098–4121, 2022.
- WANG, X.; YANG, Y.; ZHUANG, Y.; et al. Fabrication of pH-Responsive Nanoparticles with an AIE Feature for Imaging Intracellular Drug Delivery. **Biomacromolecules**, v. 17, p. 2920–2929, 2016.
- WANG, Z.; DENG, X.; DING, J.; et al. Mechanisms of drug release in pH-sensitive micelles for tumour targeted drug delivery system: a review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, p. 253–260, 2018.
- WU, J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, p. 771, 2021.
- XIE, L.; JI, X.; ZHANG, Q.; WEI, Y. Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112567, 2022.
- XIN, Y.; YUAN, J. Schiff's base as a stimuli-responsive linker in polymer chemistry. **Polymer Chemistry**, v. 3, p. 3045–3055, 2012.
- XU, J.; LIU, Y.; HSU, S. HUI. Hydrogels based on Schiff base linkages for biomedical applications. **Molecules**, v. 24, p. 1–21, 2019.
- XU, X.-Y.; MENG, X.; LI, S.; et al. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: current progress, challenges, and perspectives. **Nutrients**, v. 10, p. 1553, 2018.
- YANG, L.; LIU, T.; SONG, K.; WU, S.; FAN, X. Effect of intermolecular and intramolecular forces on hydrodynamic diameters of poly(N-isopropylacrylamide) copolymers in aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 4280–4287, 2013.
- YANG, Q. Q.; FARHA, A. K.; KIM, G.; et al. Antimicrobial and anticancer applications and related mechanisms of curcumin-mediated photodynamic treatments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, p. 341–354, 2020.
- YANG, X.; SHI, X.; D'ARCY, R.; TIRELLI, N.; ZHAI, G. Amphiphilic polysaccharides as building blocks for self-assembled nanosystems: molecular design and application in cancer and inflammatory diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p. 114–144, 2018.

YESHCHENKO, O. A.; KUTSEVOL, N. V.; TOMCHUK, A. V.; et al. Dextran-graft-PNIPAM/Au nanoparticles/ perylenediimide hybrid system as thermosensitive optical switches and fluorescent labels for potential use in nanophotonics and biomedical applications. **Optical Materials**, v. 131, p. 112753, 2022.

ZENG, L.; AN, L.; WU, X. Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

ZHANG, R. Synthesis, characterization and reversible transport of thermo-sensitive carboxyl methyl dextran/poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel. **Polymer**, v. 46, p. 2443–2451, 2005.

ZHANG, Y.; LI, K.; HAN, X.; et al. A photochemical-responsive nanoparticle boosts doxorubicin uptake to suppress breast cancer cell proliferation by apoptosis. **Scientific Reports**, v. 12, p. 10345, 2022.

ZHANG, Y.; YANG, C.; WANG, W.; et al. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive prodrug nanoparticle for combination therapy of cancer. **Scientific Reports**, v. 6, p. 212225, 2016.

ZHANG, Z.; YU, M.; AN, T.; et al. Tumor microenvironment stimuli-responsive polymeric prodrug micelles for improved cancer therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 37, p. 1–17, 2020.

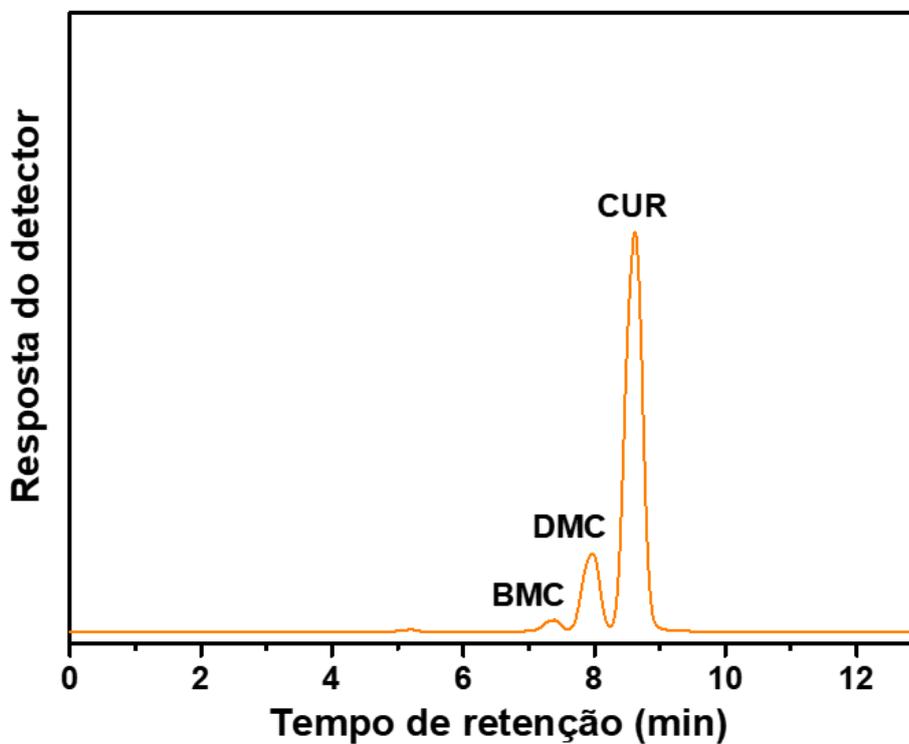
ZHAO, H.; HEINDEL, N. D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 400–402, 1991.

ZHAO, K.; LI, D.; XU, W.; et al. Biomaterials Targeted hydroxyethyl starch prodrug for inhibiting the growth and metastasis of prostate cancer. **Biomaterials**, v. 116, p. 82–94, 2017.

ZHENG, B.; MCCLEMENTS, D. J. Formulation of more efficacious curcumin delivery systems using colloid science: enhanced solubility, stability, and bioavailability. **Molecules**, v. 25, p. 1–25, 2020.

ZHOU, L.; QIU, T.; LV, F.; et al. Self-assembled nanomedicines for anticancer and antibacterial applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, p. 1–29, 2018.

**APÊNDICE A- CROMATOGRAMA DA CURCUMINA COMERCIAL E TABELA COM OS PERCENTUAIS DOS CURCUMINÓIDES**

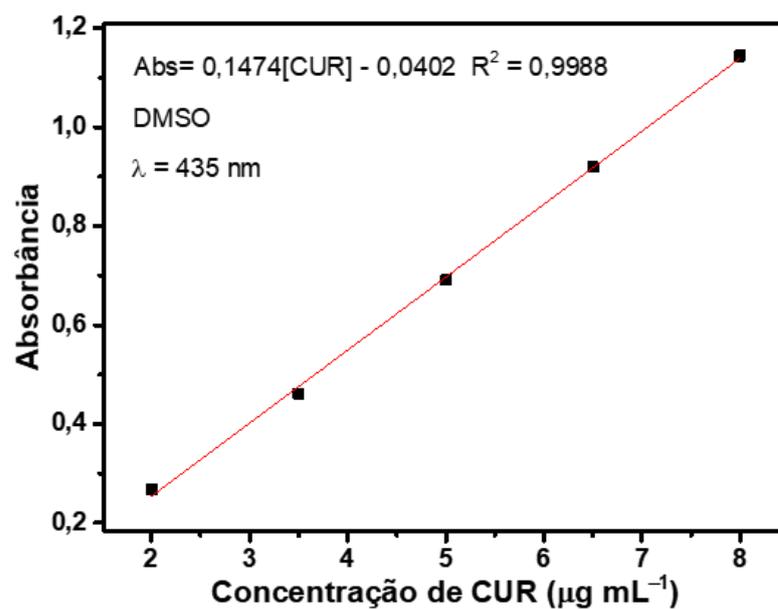
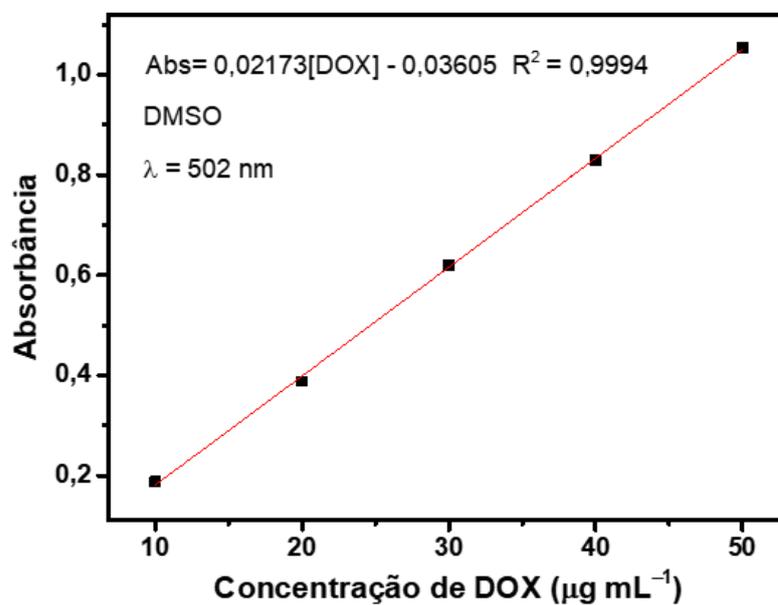


Fonte: dados da pesquisa

<b>Curcuminóides</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Percentual (%)</b>
<b>CUR</b>	8,6	81
<b>DMC</b>	8,0	16
<b>BMC</b>	7,4	3

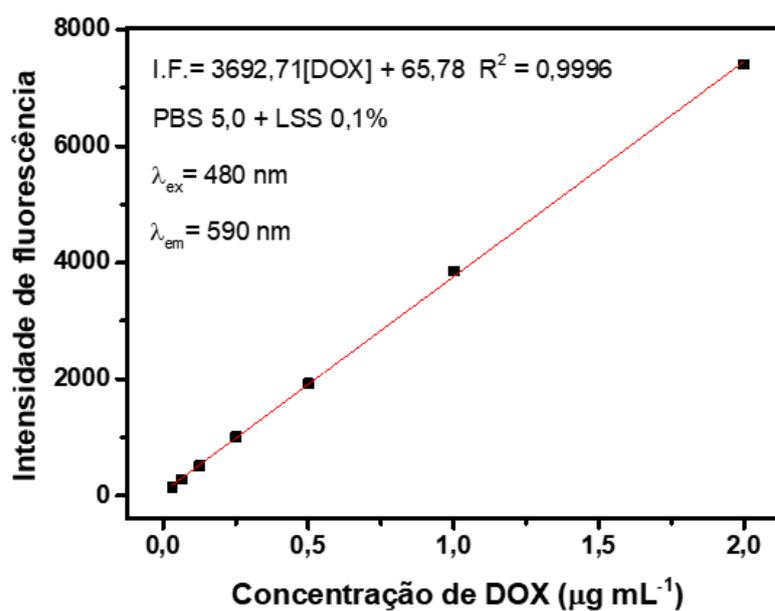
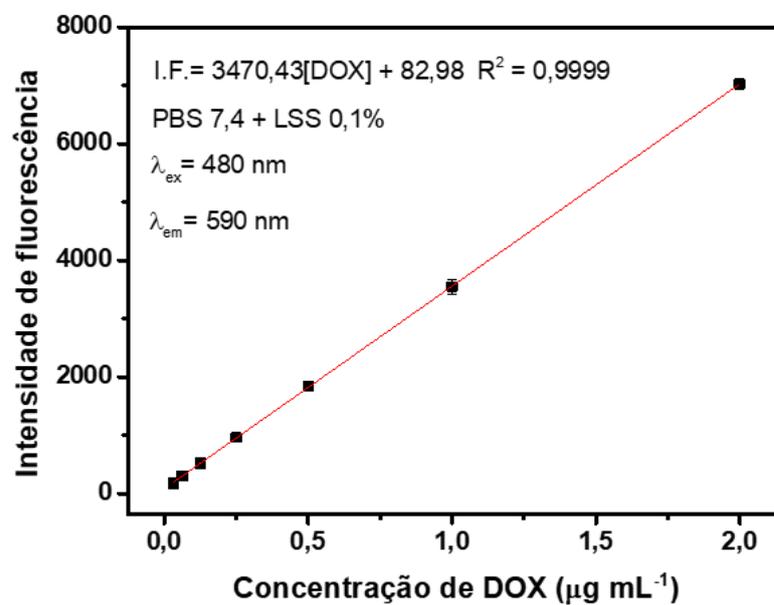
Fonte: dados da pesquisa.

## APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DOXORRUBICINA E DA CURCUMINA EM DMSO



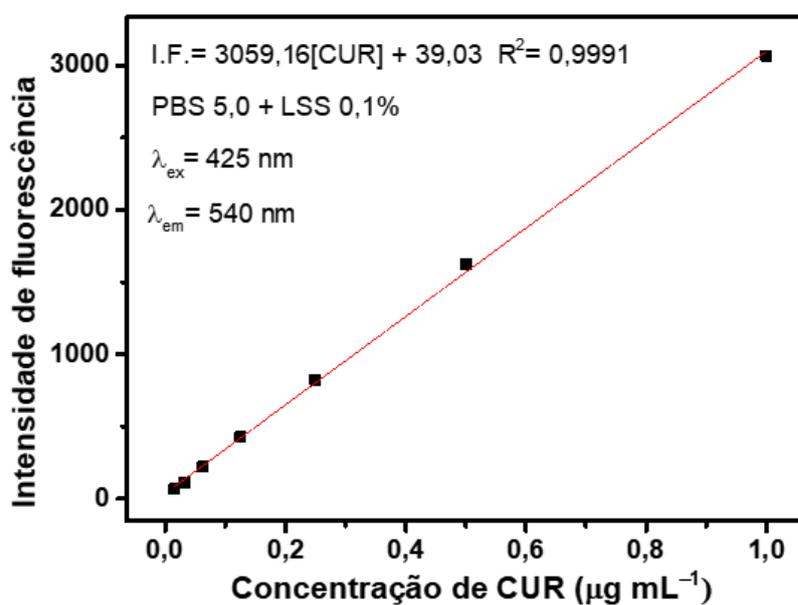
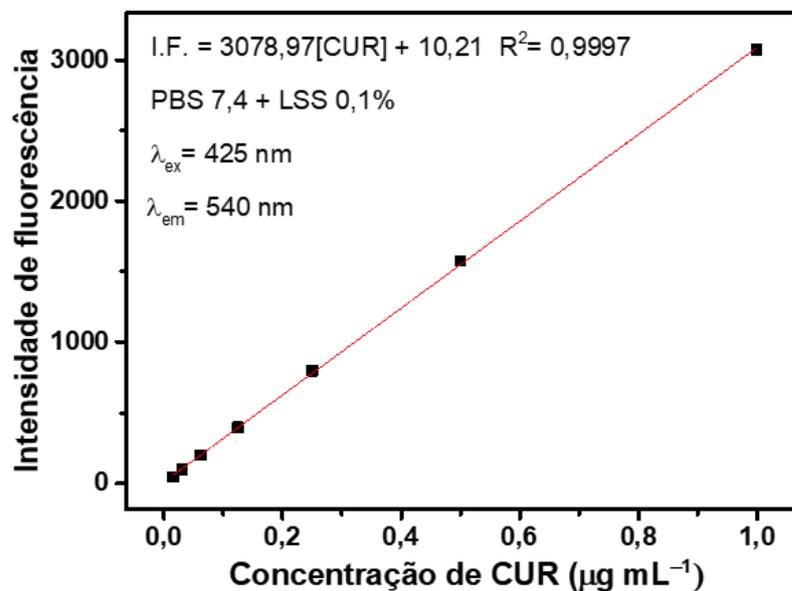
Fonte: dados da pesquisa.

**APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DOXORRUBICINA EM PBS 7,4 + LSS 0,1% E PBS 5,0 + LSS 0,1%**



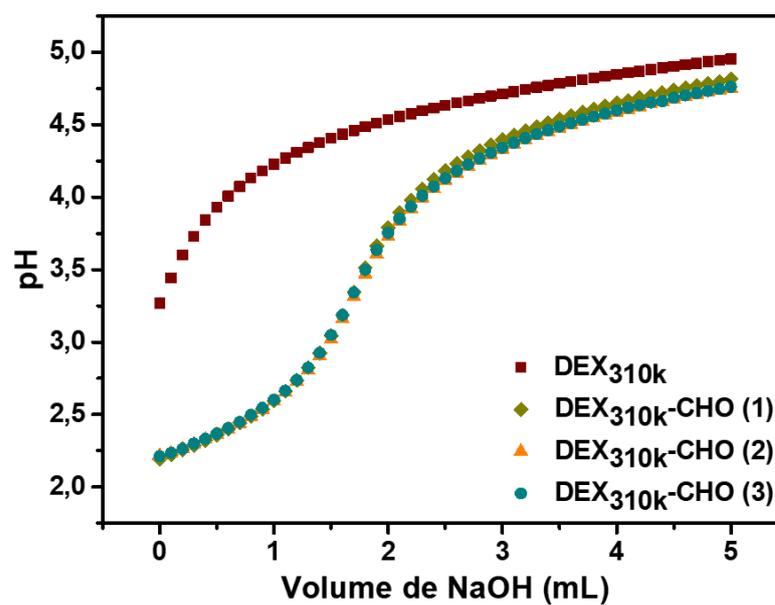
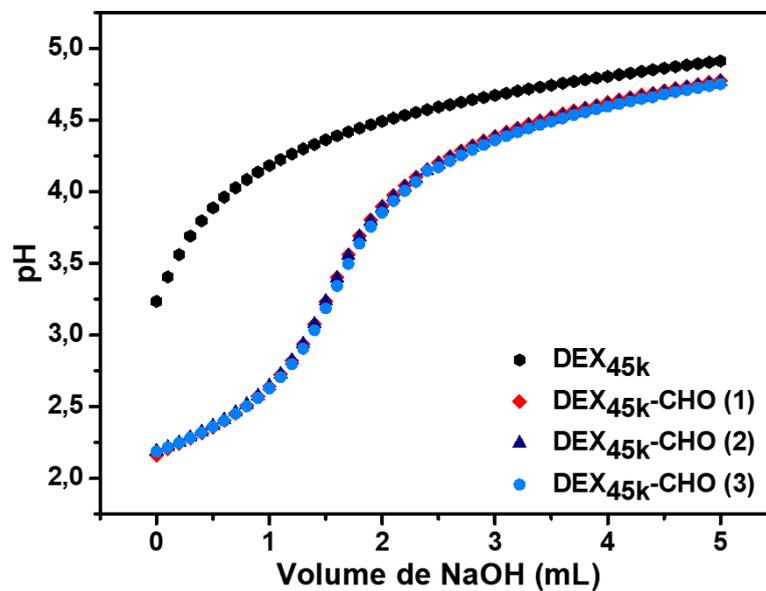
Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE D - CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CURCUMINA EM PBS 7,4 + LSS  
0,1% E PBS 5,0 + LSS 0,1%



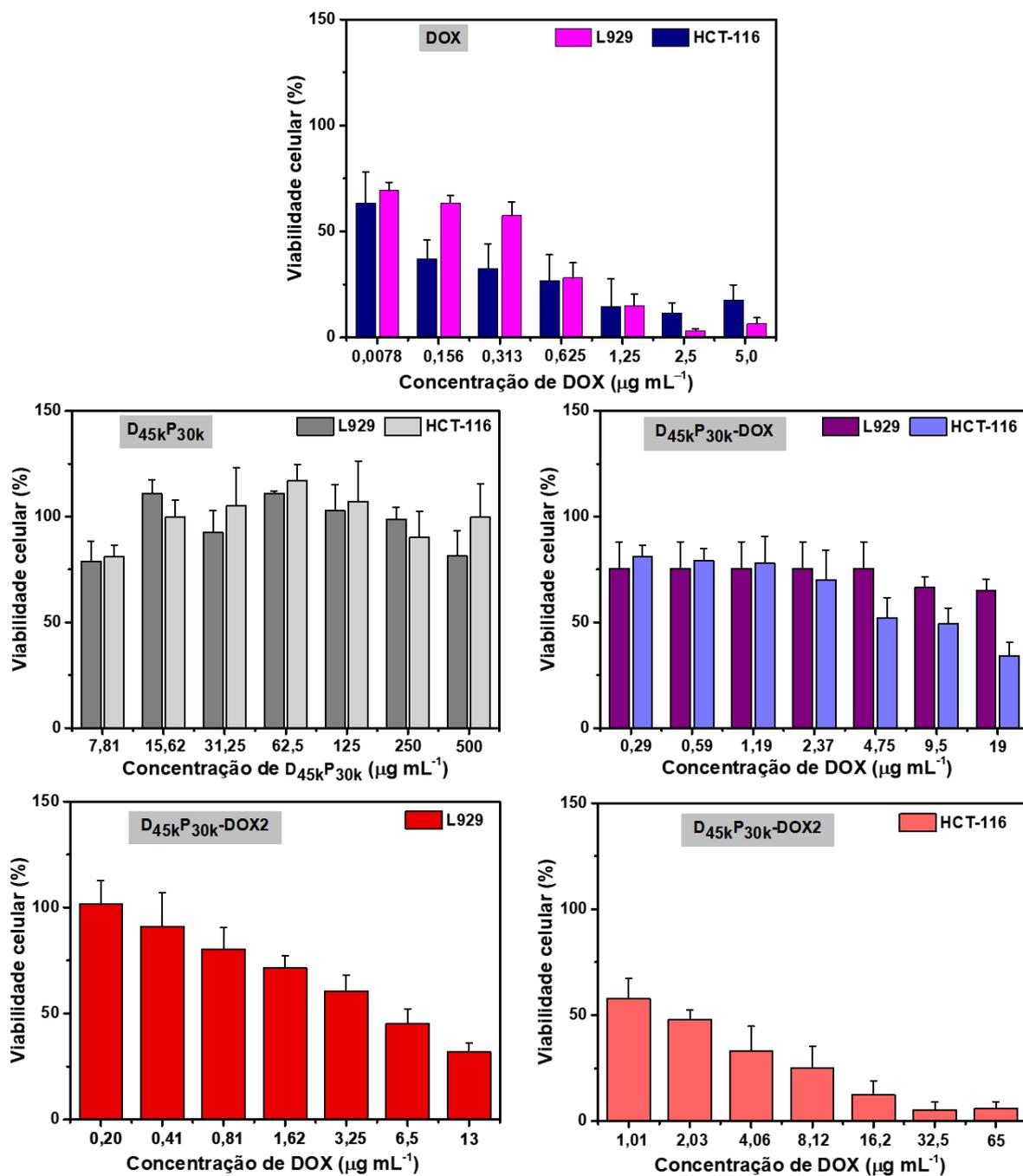
Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE E – CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DA DEX<sub>45k</sub>,  
DEX<sub>45k</sub>-CHO, DEX<sub>310k</sub> E DEX<sub>310k</sub>-CHO



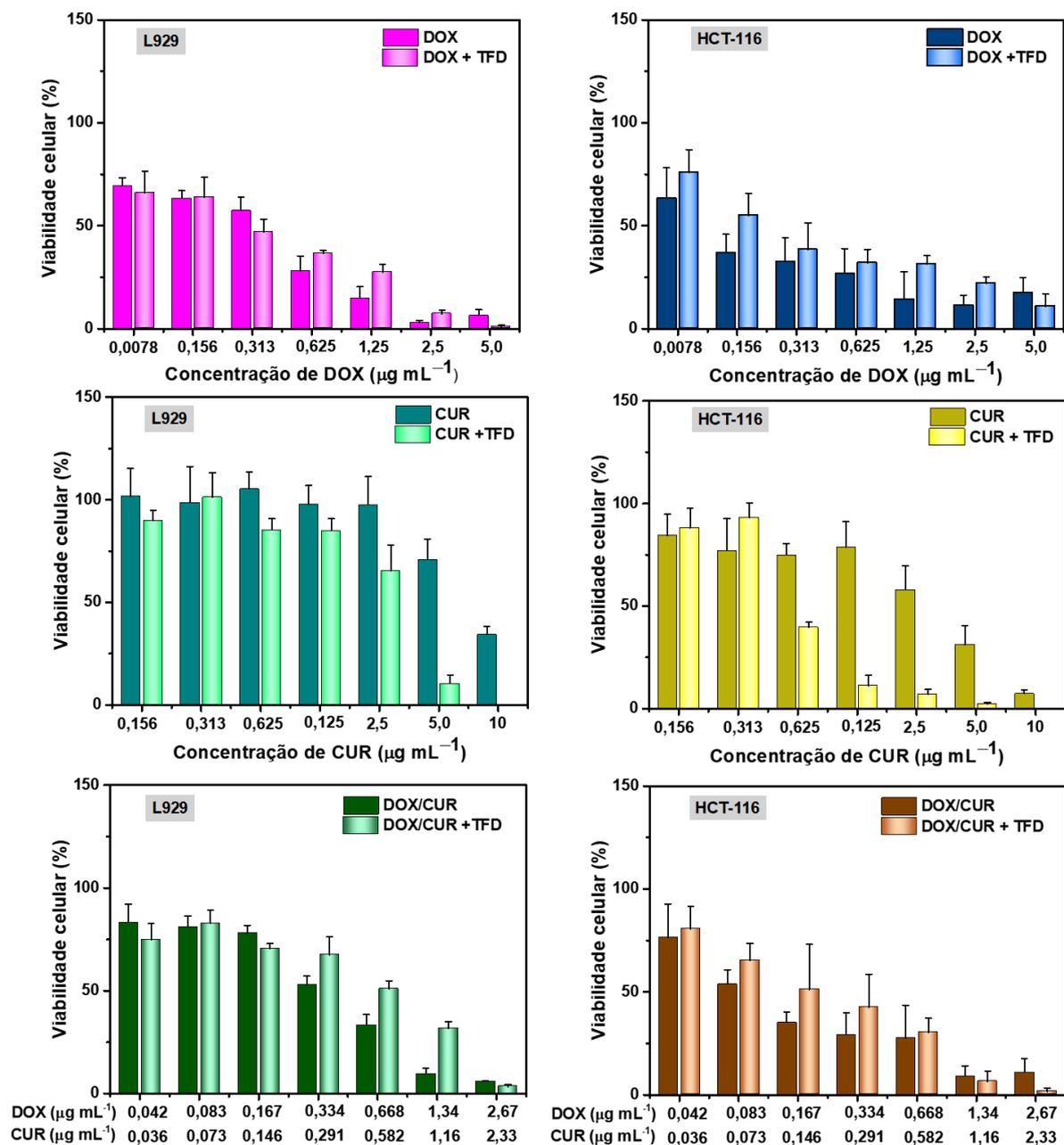
Fonte: dados da pesquisa.

**APÊNDICE F – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS L929  
E HCT-116 TRATADAS COM DOXORRUBICINA LIVRE E COM AS  
NANOPARTÍCULAS D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX E D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2**



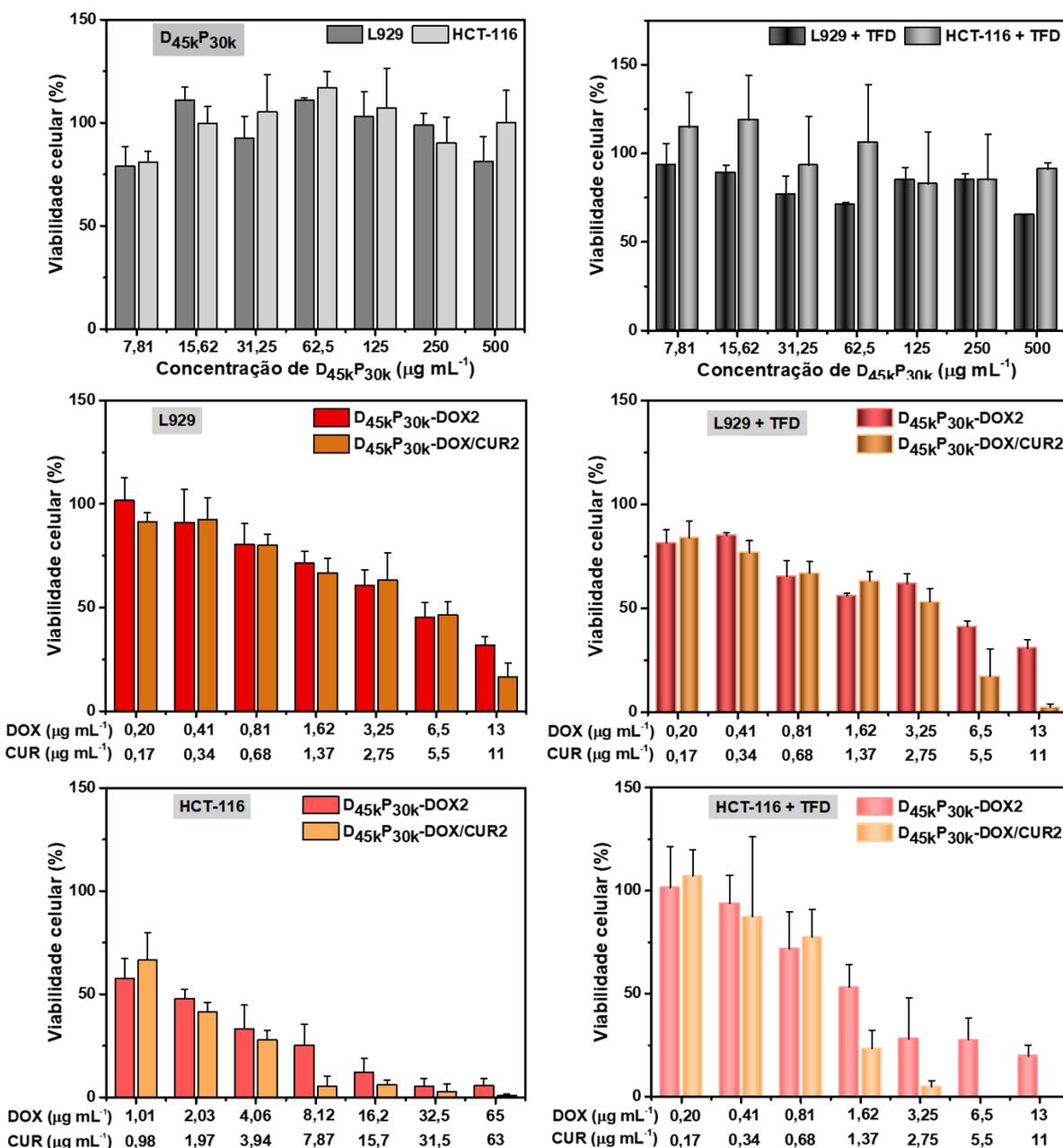
Fonte: dados da pesquisa.

**APÊNDICE G – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS L929  
E HCT-116 TRATADAS COM DOXORRUBICINA LIVRE, CURCUMINA LIVRE E  
MISTURA DOX/CUR LIVRE, SEM E COM TFD**



Fonte: dados da pesquisa.

**APÊNDICE H – GRÁFICOS DE VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS L929 E HCT-116 TRATADAS COM AS NANOPARTÍCULAS D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 E D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2, SEM E COM TFD**



Fonte: dados da pesquisa.

**APÊNDICE I – TABELA COM VALORES DE  $CI_{50}$  DAS NANOPARTÍCULAS  
**D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>, D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2 E D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX/CUR2 EM CÉLULAS L929 E HCT-116,  
SEM E COM TFD****

Nanopartículas	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	Intervalo de confiança (95%)			
	L929*	L929 + TFD*	HCT-116*	HCT-116 + TFD*
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub></b>	> 500	> 500	> 500	> 500
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>-DOX2</b>	39,82	28,64	12,78	16,8
	(33,25 - 48,45)	(23,0 - 36,7)	(8,9 - 16,6)	(13,08 - 21,82)
<b>D<sub>45k</sub>P<sub>30k</sub>- DOX/CUR2</b>	33,04	15,78	12,86	8,7
	(28,0 - 39,25)	(12,13 - 20,36)	(11,2 - 14,6)	(7,26 - 10,32)

\*Concentração de nanopartícula.

Fonte: dados da pesquisa.

## ANEXO A – FICHA DE INFORMAÇÕES DA CURCUMINA COMERCIAL

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

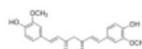
Outside USA: eurtechserv@sial.com

**Certificate of Analysis**

Product Name:

Curcumin - from Curcuma longa (Turmeric), powder

**Product Number:** C1386  
**Batch Number:** SHBL0796  
**Brand:** SIGMA  
**CAS Number:** 458-37-7  
**MDL Number:** MFCD00008365  
**Formula:** C21H20O6  
**Formula Weight:** 368.38 g/mol  
**Storage Temperature:** Store at -20 °C  
**Quality Release Date:** 01 MAY 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Yellow to Orange	Orange
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Yellow to Orange	Yellow-Orange
Solubility (Turbidity)	Clear to Hazy	Very Slightly Hazy
10 mg/mL, EtOH		
UV/VIS Absorbance	420 - 430 nm	424 nm
Purity (HPLC)	> 65 %	81 %

Michael Grady, Manager  
 Quality Control  
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.