



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALINE TEIXEIRA DOS SANTOS

**NANOPARTÍCULAS DE SULFATO DE DEXTRANA ENXERTADA COM POLI (N-
ISOPROPILACRILAMIDA) PARA O ENCAPSULAMENTO DE METOTREXATO**

FORTALEZA

2019

ALINE TEIXEIRA DOS SANTOS

NANOPARTÍCULAS DE SULFATO DE DEXTRANA ENXERTADA COM POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) PARA O ENCAPSULAMENTO DE METOTREXATO

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Judith Pessoa de Andrade Feitosa

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

S233n Santos, Aline Teixeira dos.

Nanopartículas de sulfato de dextrana enxertada com poli (N-isopropilacrilamida) para o encapsulamento de metotrexato / Aline Teixeira dos Santos. – 2019.

63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

1. Sulfato de dextrana . 2. N-isopropilacrilamida. 3. Metotrexato. I. Título.

CDD 540

ALINE TEIXEIRA DOS SANTOS

NANOPARTÍCULAS DE SULFATO DE DEXTRANA ENXERTADA COM POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) PARA O ENCAPSULAMENTO DE METOTREXATO

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Judith Pessoa de Andrade Feitosa

Aprovada em 26/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Regina Célia Monteiro de Paula
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

À minha extraordinária mãe Maria do Carmo Teixeira da Silva, símbolo de simpatia e humildade que me fortaleceu todas as vezes que me faltou coragem.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha Mãe, por ser um exemplo de mulher e pelos seus aconselhamentos sábios que me ergueram todas as vezes que quis fraquejar; por todos os dias que estive ao meu lado, pelas brincadeiras, brigas e reconciliações.

Ao meu Tio Paulo, por ser um exemplo de superação e sempre torcer pelas minhas vitórias tanto pessoais como profissionais; um pai que meu coração adotou para ser uma espécie de inspiração na minha trajetória de vida.

A Nádia, por sempre colaborar com sua amizade e companheirismo, além de contribuir para a construção deste trabalho realizando com lisura seu ofício.

À Natália, pelos momentos de reflexões filosóficas sobre a vida, pelo apoio psicológico durante toda a minha estadia no Laboratório de Polímeros; uma amizade que surgiu por acaso, mas que se tornou sólida e frutífera.

Ao José, que me ajudou no início da atividade no laboratório, além de sempre ser meu grande parceiro na vida; sem ele talvez não conseguisse seguir na vida acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório de Polímeros, em especial: Venícios, Rayane, Irisvan, Vanessa, Ribamar, Leonira, Everton, Laís, Ana Rosa, Maria, Ludy e Wesley.

À minha orientadora Prof^a. Judith, por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação, pela sua paciência em administrar as etapas da pesquisa realizada.

As demais professoras do grupo de pesquisa: Regina Célia, Pablyana e Jeanny por contribuírem com a continuidade das pesquisas do laboratório.

A todos os meus amigos que me ajudaram de forma direta e indireta, sempre dando apoio, com palavras de incentivo e conselhos para vida acadêmica e pessoal.

Ao CENAUREM pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

A Central Analítica pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-graduação em Química.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, que afeta cerca de 1% da população mundial. Gera deformidade e destruição articular, devido à ocorrência da erosão óssea e cartilaginosa. Nanopartículas de copolímeros anfifílicos à base de polissacarídeos e seus derivados têm sido amplamente estudados, por serem biocompatíveis e biodegradáveis, o que as tornam materiais promissores para aplicações biomédicas. Copolímeros termorresponsivos enxertados com N-isopropilacrilamida (NIPAM) são candidatos à liberação de fármacos, pois são capazes de alterar a sua estrutura de forma rápida e reversível como resposta à elevação da temperatura. O sulfato de dextrana (DS) apresenta biocompatibilidade com os macrófagos responsáveis pelos complexos inflamatórios na artrite reumatóide, além de ser obtido por bactérias, o que facilita o controle da sua composição química em escala industrial. O objetivo desse trabalho é sintetizar e caracterizar nanopartículas termossensíveis à base de DS enxertada com NIPAM para o tratamento da artrite reumatoide. Os copolímeros foram sintetizados por copolimerização radicalar e a influência da quantidade de NIPAM foi analisada. Os produtos obtidos foram caracterizados por FTIR e RMN. Os espectros de FTIR dos copolímeros apresentaram bandas características do DS e do PNIPAM. Na RMN de próton detectou-se também a presença de sinais característicos do DS e do PNIPAM, confirmando assim a reação de enxertia. Os copolímeros apresentaram transição de fase com aumento da temperatura. As temperaturas de transição foram menores para os copolímeros com razão molar NIPAM/DS de 3 (33°C) e de 1 (34°C) devido ao menor teor de PNIPAM. O espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostrou que dos copolímeros obtidos, o DS-g-3PNIPAM apresentou maior raio hidrodinâmico e melhor homogeneidade e uma concentração de associação crítica de 0,176 mg/mL, menor que a do DS-g-PNIPAM. As nanopartículas formadas pelo copolímero DS-g-3PNIPAM apresentaram estrutura esférica e tamanho inferior ao observado por DLS. O DS-g-3PNIPAM se mostrou o mais indicado para a incorporação do metotrexato, apresentando uma eficiência de encapsulamento de 27,6% e um conteúdo de fármaco de 5,7%.

Palavras-chave: Sulfato de dextrana. N-isopropilacrilamida. Metotrexato.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease, affecting about 1% of the world's population. It generates joint deformity and destruction due to the occurrence of bone and cartilaginous erosion. Nanoparticles of amphiphilic copolymers based on polysaccharides and their derivatives have been widely studied because they are biocompatible and biodegradable, which makes them promising materials for biomedical applications. N-isopropylacrylamide-grafted thermo-responsive copolymers (NIPAM) are candidates for drug release because they are able to change their structure rapidly and reversibly as a response to temperature rise. The dextran sulphate (DS) has biocompatibility with the macrophages responsible for the inflammatory complexes in rheumatoid arthritis, in addition to being obtained by bacteria that favors the control of structure in industrial scale. This work aims to synthesize and characterize thermosensitive nanoparticles based on DS grafted with NIPAM for the treatment of rheumatoid arthritis. The copolymers were synthesized by radical copolymerization and the influence of the amount of NIPAM was analyzed. The products were characterized by FTIR and RMN. The copolymers showed bands characteristic of the DS and PNIPAM. ¹H NMR detected the presence of signals characteristic of the DS and the PNIPAM, confirming the grafting. The copolymers showed phase transition with increasing temperature. Transition temperatures were lower for the DS-g-3PNIPAM (33 °C) and DS-g-PNIPAM (34 °C) copolymers because of the lower PNIPAM content. The Dynamic Light Scattering (DLS) showed that of the copolymers obtained, the DS-g-3PNIPAM presented a greater hydrodynamic radius and better homogeneity. The DS-g-3PNIPAM copolymer had a critical association concentration (CAC) of 0.176 mg / mL, being lower than that of DS-g-PNIPAM at 50 °C. The nanoparticles formed by the DS-g-3PNIPAM copolymer showed spherical structure and size smaller than that observed by DLS. Among the copolymers studied, DS-g-3PNIPAM was shown to be the most suitable for the incorporation of methotrexate, presenting an encapsulation efficiency of 27,6 and as a drug content a value of 5,7.

Keywords: Dextran sulfate. N-isopropylacrylamide. Methotrexate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura molecular do DSS com grau de sulfatação 2.....	20
Figura 2	– Fórmula estrutural do monômero, NIPAM (a) e de seu polímero, PNIPAM (b).....	22
Figura 3	– Interações do PNIPAM com água abaixo e acima da LCST.....	23
Figura 4	– Representação de modificação de polissacarídeo via a) <i>grafting from</i> ; b) <i>grafting to</i> e c) <i>grafting through</i>	24
Figura 5	– Esquema geral das etapas da polimerização radicalar de um monômero vinílico (M) em um polissacarídeo (P), iniciada pela espécie I.....	26
Figura 6	– Proposta esquemática da reação de síntese do copolímero DS/PNIPAM.....	35
Figura 7	– Proposta mecanística da degradação da cadeia polimérica do DS promovida pelo sistema de iniciação KPS/TEMED.....	36
Figura 8	– Espectros de FTIR dos copolímeros e dos materiais de partida.....	37
Figura 9	– Cromatogramas do DS e copolímeros.....	39
Figura 10	– Espectro de ^1H NMR do PNIPAM.....	41
Figura 11	– Espectro de HSQC do DS com grau de sulfatação 2	43
Figura 12	– Espectros de RMN ^1H dos copolímeros DS-g-PNIPAM em (A) e DS-g-3PNIPAM em (B).....	44
Figura 13	– TGAs (A) e DTGs (B) dos materiais de partida e do copolímero DS-g-3PNIPAM em atmosfera de nitrogênio.....	45
Figura 14	– Curvas de DSC do DS, PNIPAM e dos copolímeros.....	47
Figura 15	– Relação entre a razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno <i>versus</i> a concentração dos copolímeros em água: em (A) DS-g-PNIPAM e (B) DS-g-3PNIPAM.....	50

Figura 16 – Relação do tamanho de partícula com a temperatura de A – Sulfato de dextrana, B – PNIPAM, C – DS-g-PNIPAM e DS-g-3PNIPAM.....	51
Figura 17 – Distribuição de tamanho das nanopartículas na temperatura de transição.....	51
Figura 18 – Agregação promovida pelo aumento da temperatura, onde: a – representa a interação dos copolímeros com moléculas de água, b – mostra que a elevação da temperatura ocasiona a desidratação e por consequência um aumento de interações da cadeia lateral e c – ilustra a formação de agregados.....	53
Figura 19 – Estabilidade dos copolímeros onde (A) DS-g-PNIPAM e (B) DS-g-3PNIPAM, ambos em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.....	55
Figura 20 – Micrografia para a nanopartícula DS-g-3PNIPAM na concentração de 0,1 mg/mL.....	56
Figura 21 – Histograma de tamanhos relativos das nanopartículas do DS-g-3PNIPAM.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Opções de tratamento para artrite reumatoide.....	17
Tabela 2	– Os rendimentos reacionais dos copolímeros não purificados e purificados.....	34
Tabela 3	– Área das bandas 1544, 1468 e 1016 cm^{-1} de absorção na região do infravermelho dos copolímeros.....	38
Tabela 4	– Valores dos volumes de eluição dos copolímeros.....	39
Tabela 5	– Teores de carbono, nitrogênio, enxofre e PNIPAM presentes nos copolímeros e valores do grau de substituição.....	40
Tabela 6	– Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HSQC do DS.....	43
Tabela 7	– Parâmetros de estabilidade térmica do DS, PNIPAM e do copolímero DS-g-3PNIPAM.....	46
Tabela 8	– Propriedades das nanopartículas auto-organizadas (37 °C).....	52
Tabela 9	– Propriedades das nanopartículas auto-organizadas (50 °C).....	52
Tabela 10	– Dados da literatura sobre o encapsulamento promovido por copolímeros de PNIPAM.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
AR	Artrite Reumatoide
CF	Conteúdo de Fármaco
CAC	Concentração de Associação Crítica
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMARD	Fármacos Antirreumáticos Modificadores da Doença
DS	Sulfato de dextrana
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DS-g-PNIPAM	Copolímero com razão molar (1:1) de DS e PNIPAM
DS-g-3PNIPAM	Copolímero com razão molar (1:3) de DS e PNIPAM
EE	Eficiência de Encapsulamento
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
KPS	Persulfato de potássio
LCST	Temperatura crítica de solução inferior
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NIPAM	N-Isopropilacrilamida
PNIPAM	Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)
PNIPAM/DS	Relação molar de poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)/Sulfato de dextrana
RCNP	Rendimento dos copolímeros não purificados
RCP	Rendimento reacional dos copolímeros purificados
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametileno-diamino
TGA	Análise Termogravimétrica
UCST	Temperatura crítica de solução superior
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Artrite Reumatoide (AR)	16
1.2	Nanotecnologia	18
1.3	Sulfato de dextrana	19
1.4	Polímeros termorresponsivos	20
1.5	Poli (N-isopropilacrilamida)	21
1.6	Copolímeros por enxertia	22
1.7	Polimerização via radicais livres	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Materiais	27
3.2	Síntese e purificação dos copolímeros	27
3.3	Incorporação do metotrexato	28
3.4	Caracterização dos copolímeros	30
3.4.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	30
3.4.2	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	30
3.4.3	<i>Análise Elementar (CHNS)</i>	31
3.4.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	31
3.4.5	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	31
3.4.6	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	31
3.5	Caracterização das nanopartículas obtidas	31
3.5.1	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i>	31
3.5.2	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i>	32
3.5.3	<i>Estabilidade em tampão fosfato (pH 7,4)</i>	33
3.5.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Síntese dos copolímeros	34
4.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	36

4.3	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	38
4.4	Análise Elementar (CHNS).....	39
4.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹ H) e (RMN ¹³ C).....	40
4.6	Análise Termogravimétrica (TGA).....	45
4.7	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	47
4.8	Nanopartículas via auto-organização.....	48
4.8.1	<i>Concentração de associação crítica (CAC)</i>	48
4.8.2	<i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i>	50
4.8.3	<i>Estabilidade em tampão fosfato (pH 7,4)</i>	54
4.8.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	55
4.9	Incorporação do Metotrexato.....	57
4.9.1	<i>Determinação da Eficiência de encapsulamento e Conteúdo de fármaco do MTX</i>	57
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por dor nas articulações, inchaço, destruição do osso e cartilagem, que afeta de 0,3 a 1,0% da população mundial (TAYLOR *et al.*, 2016). Paciente com AR tem 40% de aumento no risco de mortalidade e aumento de incidência de doenças cardiovasculares, com nível elevado de marcadores inflamatórios. Podem ser administrados no combate à AR, medicamentos antirreumáticos, tais como: Metotrexato (MTX), leflunomida, sulfassalazina e hidroxicloroquina. Dentre esses medicamentos, o MTX é considerado como um fármaco eficaz desde 1980 (SCHETT *et al.*, 2016).

As várias formas de dosagem convencionais disponíveis para o tratamento da AR incluem comprimidos, cápsulas, líquidos orais e produtos tópicos. As principais desvantagens associadas às formas de dosagem convencionais para o tratamento da AR são a baixa adesão, meia-vida curta, biodisponibilidade e baixa solubilidade do fármaco, que pode ser melhorada por novas formas de administração (MOVAHEDI *et al.*, 2016).

As nanopartículas (NPs) são utilizadas como agentes terapêuticos de imagem e aplicações diagnósticas. Fármacos encapsulados por nanopartículas anfifílicas ajudam na entrega direcionada e/ou liberação controlada. Nanopartículas conjugadas com ligantes específicos facilitam a penetração celular (JANAKIRAMAN *et al.*, 2018).

Dextrana é um candidato altamente adequado para a modificação química, sendo hidrofílica e biocompatível. Na sua forma sulfatada apresenta-se como ligante específico para macrófagos ativados que se fazem presentes em regiões inflamadas devido à AR (KIM *et al.*, 2013). A dextrana sulfatada (DS) tem potencial para liberação direcionada de fármaco.

Diversos polímeros têm sido utilizados para comporem as cadeias laterais dos copolímeros anfifílicos. Dentre eles, se destacam os polímeros inteligentes que alteram sua estrutura e suas propriedades físicas e químicas em resposta a estímulos externos, tais como: temperatura, pH, força iônica e luz. O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) é um polímero inteligente com propriedades sensíveis à variação de temperatura. Ele tem sido bastante estudado no campo biomédico, principalmente por apresentar uma transição de fase próxima à temperatura do

corpo humano (32 °C) (SCHILD, 1992; ZHANG *et al.*, 2015).

Aplicações bem sucedidas de polímeros inteligentes nanocarreadores dependem da possibilidade de controlar o equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico da macromolécula à temperatura fisiológica. Um possível ajuste da hidrofobicidade desses polímeros e da regulação da região de transição de fase e também do tamanho dos domínios hidrofóbicos por variação do copolímero foi relatada por Chumachenko *et al.* (2017).

1.1 Artrite Reumatoide (AR)

A artrite reumatóide (AR) é uma inflamação crônica complexa, doença caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e invasão consequente de células imunes, como macrófagos ativados e linfócitos (HEO *et al.*, 2017). Como muitas outras doenças, a AR é uma combinação de fatores genéticos e fatores ambientais que aumentam a suscetibilidade. Geralmente, no início da artrite reumatoide os pacientes apresentam apenas um pequeno número de articulações inchadas, rigidez matinal e fadiga. Com o tempo, as fases da doença progridem e passam a ser caracterizadas por poliartrite simétrica, especialmente nas mãos e pés. O agravamento desses sintomas pode ocasionar dano articular e deformidades articulares, juntamente com limitações funcionais e perda de qualidade de vida e até mesmo a morte (SANMARTÍ; RUIZ-ESQUIDE; HERNÁNDEZ, 2013).

Os avanços no tratamento da AR estiveram associados à regulação negativa do progresso da doença e inibição do dano articular. No entanto, torna-se necessária uma administração frequente em longo prazo de fármacos que resultam em efeitos colaterais sistêmicos indesejados (DOLATI *et al.*, 2016). O tratamento da AR utiliza práticas de estratégia intensiva, uma vez que as evidências científicas mostram que melhoram o curso da doença. Essas estratégias intensivas são baseadas em dois fatores principais: (a) controle rígido do processo inflamatório e (b) estabelecimento de um objetivo de tratamento baseado em índices da atividade da doença, que avalia 28 articulações (mãos, punhos, cotovelos, ombros, joelhos), além de resultados colhidos de exames de velocidade de hemossedimentação (VHS) ou proteína C reativa (PCR), e percepção global da doença pelo paciente (TOLEDANO *et al.*, 2018).

Para um paciente com a doença ativa é recomendada a terapia inicial

com anti-inflamatórios não esteroides (AINE) e/ou corticoides. Apesar do efeito rápido sobre os sintomas, essa terapia não altera o curso da doença. São introduzidos então, fármacos antirreumáticos modificadores da doença, denominados DMARD (SANMARTÍ *et al.*, 2013). A Tabela 1 mostra as opções de tratamento e os efeitos colaterais causados pelo uso de fármacos em longo prazo.

Tabela 1 - Opções de tratamento para artrite reumatoide

Classe	Indicações	Exemplos de agentes	Riscos e efeitos colaterais
AINEs	Reduzir inflamação aguda diminuindo assim a dor	Aspirina, Ibuprofeno, naproxeno	Distúrbio gastrointestinal e disfunção renal
		Celecoxibe	Menor incidência de distúrbio gastrointestinal
Corticoides	Anti-inflamatório	Prednisona, dexametasona	Resistência à insulina, afinamento da pele, osteoporose, hipertensão
		Metotrexato	Cirrose hepática, pneumonia intersticial, mielossupressão
DMARDs	Alterar o curso da doença	Sulfassalazina	Hipersensibilidade e reações alérgicas
		Hidroxicloroquina	Retinopastia
		Leflunomida	Cirrose hepática e mielossupressão
		Sais de ouro	Reações de hipersensibilidade e Nefrite

Fonte: Adaptada de Mitrogotri e Yoo (2011)

Por apresentar uma vasta aplicação, o metotrexato (MTX) é uma das primeiras apostas para o tratamento de doenças autoimunes, além de ser um agente antineoplásico utilizado no tratamento de câncer de mama, pulmão, e de leucemia, linfoma, osteossarcoma e neoplasias da bexiga (BOGUSZ *et al.*, 2019). Para tratamentos antirreumáticos, o MTX é frequentemente usado em combinação com outros agentes biológicos. Entretanto, o uso em longo prazo do MTX e em altas

doses por administração sistemática tem sido associado à resistência a medicamentos e a efeitos colaterais adversos (CHENG; LEE, 2017). Os efeitos colaterais mais frequentes decorrentes da dosagem de MTX incluem feridas na boca, estomatite e diminuição da quantidade de glóbulos brancos. Uma dose elevada por mais tempo produz hepatotoxicidade grave, nefrotoxicidade, e supressão da medula óssea. Outros efeitos colaterais causados por MTX incluem erupções cutâneas, comichão, tonturas, perda de cabelo e sonolência (DHANKA; SHETTY; SRIVASTAVA, 2017).

Uma estratégia para superar este desafio é desenvolver nanocarreadores para MTX que direcionem o fármaco para macrófagos ativados nas regiões inflamadas, reduzindo a fração do MTX necessária para o tratamento.

1.2 Nanotecnologia

Nanopartículas (NPs) são estruturas com dimensões na escala nanométrica que têm se destacado para aplicações em áreas de cosméticos, alimentos e principalmente na área farmacêutica. Elas são utilizadas como sistema de liberação de fármaco, pois desempenham um papel fundamental na proteção dos medicamentos aos fatores ambientais pH, temperatura e degradação enzimática (DE PAULA; FEITOSA; PAULA, 2015). As nanopartículas devem ser capazes de: (a) encapsular e evitar a degradação dos medicamentos, (b) melhorar a liberação do fármaco e (d) poder ser produzida em grandes quantidades e em escala reprodutível.

O diâmetro normal dos portadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), ou portadores de materiais hidrofóbicos, varia de 10 a 1000 nm. No entanto, para liberação específica no local, um intervalo de 50 a 300 nm é preferido, especialmente para distúrbios do sistema nervoso central e agentes quimioterápicos. NPs com tamanho na faixa de 50 a 300 nm proporcionam uma melhor penetração de barreiras, maior captação nas células e ação rápida (KHOSA; REDDIA; SAHAB, 2018).

As NPs podem ser empregadas *in vivo* por mecanismos de segmentação ativa e segmentação passiva. Na segmentação passiva, as nanopartículas podem ser fagocitadas por macrófagos, mesmo sem modificações em sua superfície, visto que em articulações inflamadas ocorre uma elevação da presença de macrófagos. Na segmentação ativa se faz necessária a utilização de ligantes direcionadores para

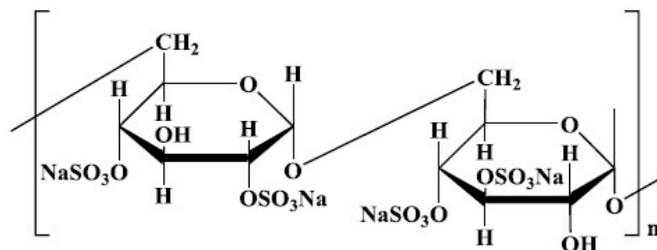
uma melhor distribuição de sistemas NPs no local desejado (PHAM, 2011). Um dos direcionadores é o sulfato de dextrana (DS), que pode atuar como um ligante para macrófagos da classe de receptor A (SR-A), sendo superexpressos por macrófagos ativados. Portanto, as nanopartículas baseadas em DS podem efetivamente alcançar articulações inflamadas por mecanismos de segmentação ativa, tornando-as portadoras ideais de fármacos para terapia de AR (HEO *et al.*, 2017).

1.3 Sulfato de dextrana

A dextrana é um polissacarídeo com uma cadeia principal de D-Glucose ligada α -(1 \rightarrow 6) com proporções variáveis de ligações. É um polímero altamente linear produzida por *Leuconostoc spp.* e microrganismos relacionados. Ela é versátil por causa de sua solubilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. (CÁMARA *et al.*, 2018).

O sulfato sódico de dextrana (DSS), representado na Figura 1, é um derivado polianiónico de dextrana com até 3 grupos sulfato de sódio ($-\text{SO}_3\text{Na}$) ligados a cada unidade de repetição. DSS é amplamente aplicado em alimentos, biotecnologia, indústria farmacêutica e cosmética (YU *et al.*, 2018).

Figura 1 - Estrutura molecular do DSS com grau de sulfatação 2



Fonte: O autor

A presença de vários grupos funcionais, como hidroxila e sulfato, permite que o polissacarídeo seja modificado através da inserção de grupos hidrofóbicos ou hidrofílicos. A inserção de uma cadeia polimérica ou a copolimerização de um monômero em um polissacarídeo pode promover a formação de nanopartículas auto-organizadas (MAYA *et al.*, 2013).

1.4 Polímeros termorresponsivos

Polímeros termorresponsivos são uma classe de materiais “inteligentes” que têm a capacidade de responder à mudança de temperatura. Essa propriedade os torna materiais úteis em uma ampla gama de aplicações e, conseqüentemente, atrai muito interesse científico. Eles são usados para aplicações biomédicas, incluindo liberação de fármacos e engenharia de tecidos (GANDHI *et al.*, 2015).

Polímeros sensíveis à temperatura exibem uma transição de fase de volume em uma determinada temperatura através da sua desidratação, o que provoca uma mudança súbita no estado de solvatação. Polímeros que se tornam insolúveis com o aquecimento têm uma temperatura crítica de solução inferior (LCST). Os sistemas que se tornam solúveis por aquecimento têm temperatura crítica superior da solução (UCST) (HACKER *et al.*, 2008; SHIMIZU; FUJITA; NAGAMORI, 2010).

Os sistemas LCST e UCST não estão restritos ao ambiente aquoso, mas apenas os sistemas aquosos são de interesse para aplicações biomédicas. A mudança no estado de hidratação, que provoca a transição de fase volumétrica, reflete propriedades competitivas de ligações de hidrogênio, onde são favorecidas as ligações de hidrogênio intermolecular das moléculas de polímero em comparação à solubilização promovida pela água (LIU; URBAN, 2010).

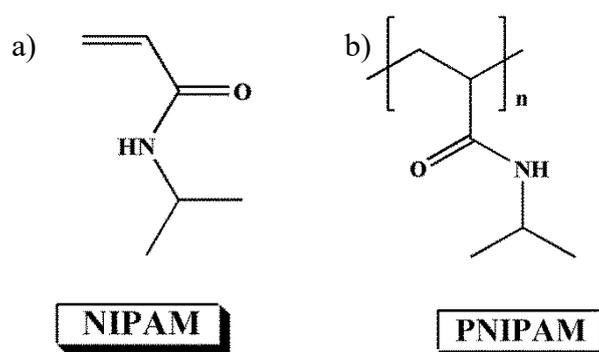
Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em polissacarídeos que exibem propriedades termorresponsivas quando em solução aquosa, e as possíveis aplicações que possam surgir disso. Enquanto alguns PS que ocorrem naturalmente são termorresponsivos outros requerem modificação química de suas estruturas para tornar-se sensível às mudanças de temperatura. Uma dessas modificações pode ser a copolimerização. Copolímeros termorresponsivos podem ser obtidos através da conjugação desses polímeros sintéticos com polissacarídeos não-termorresponsivos. Um polímero sintético amplamente pesquisado com propriedades termorresponsivas é a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) (GRAHAM; MARINA; BLENCOWE, 2019).

Entre muitos polímeros termorresponsivos estudados nas últimas décadas, a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) tem gerado um grande interesse e é atualmente o mais investigado na literatura, devido sua ampla gama de aplicações (WEI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015).

1.5 Poli(N-propilacrilamida)

A poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) (Figura 2) é um polímero sintético sensível à temperatura, da família dos polímeros poli(acrilamida), onde a propriedade termossensível do mesmo foi estudada sistematicamente pela primeira vez por Heskins e Guillet (HESKINS; GUILLET, 1968).

Figura 2 - Fórmula estrutural do monômero, NIPAM (a) e de seu polímero, PNIPAM (b)



Fonte: O autor

A termorresponsividade pode ser investigada através de valores de LCST. Abaixo da LCST, as cadeias do PNIPAM são solúveis em água devido à existência de ligações de hidrogênio entre o polímero (grupos amida) e moléculas de água. Acima da LCST, as ligações de hidrogênio com a água não são favorecidas e o PNIPAM apresenta uma preferência por realizar as ligações de hidrogênio com grupamentos semelhantes a ele, acarretando em uma expulsão de moléculas de água da rede polimérica (SLIWA *et al.*, 2014)(Figura 3).

Figura 3 - Interações do PNIPAM com água abaixo e acima da LCST



Fonte: Adaptada de Wang e Wu (2012).

Como o PNIPAM tem grupamento hidrofílico (amida) e grupamento hidrofóbico (hidrocarbila e isopropila) em sua estrutura, ele exibe uma transição de fase volumétrica acima da temperatura crítica inferior da solução (LCST), que ocorre em torno de 32 °C em meio aquoso (HESKINS; GUILLET, 1968; WU; ZHOU, 1995). A transição de fase, em água, do poli(N-isopropilacrilamida) fornece a ferramenta ideal para estudar a influência da estrutura molecular interna, ou seja, da sua densidade de enxertia (CHEN *et al.*, 2012; HAMMOUDA; JIA; CHENG, 2015).

Assim, o PNIPAM é solúvel à temperatura ambiente, mas sofre transição de fase perto da temperatura fisiológica (37 °C). Esse polímero pode ser usado para o encapsulamento e liberação controlada de fármacos (KUTSEVOL *et al.*, 2018).

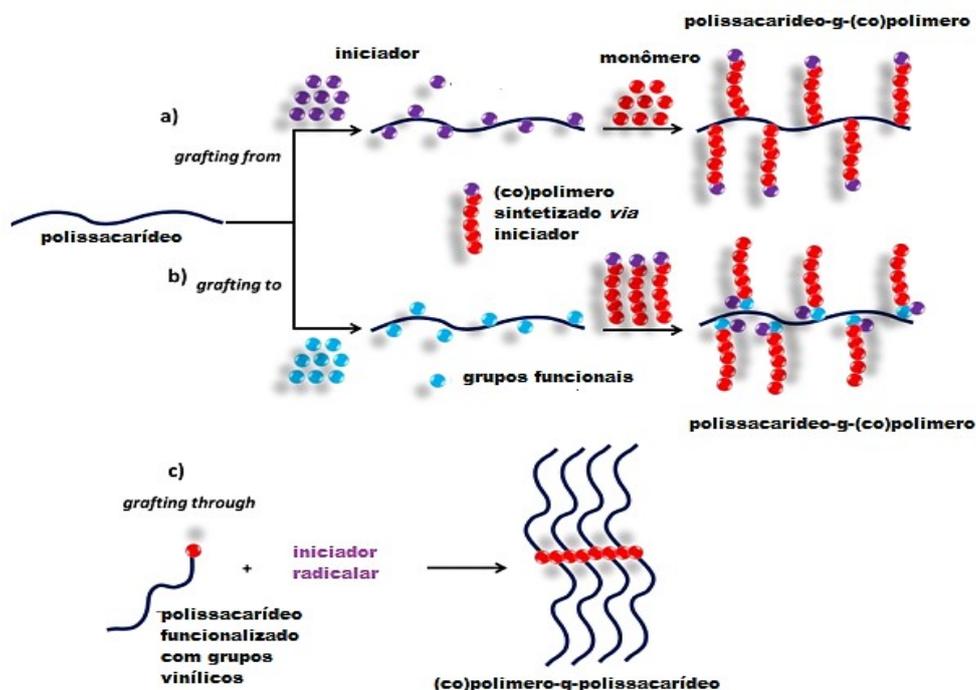
1.6 Copolímeros por enxertia

Vários copolímeros por enxertia têm sido sintetizados. Àqueles que têm em sua composição polímeros naturais se destacam por adquirirem propriedades adequadas para aplicações biomédicas, como carreadores de fármacos. Polissacarídeos e seus derivados são materiais promissores neste campo por serem biocompatíveis e biodegradáveis. No geral, eles compõem a cadeia principal dos copolímeros (KALIA; SABAA, 2013; MAHANTA *et al.*, 2015; DE PAULA; FEITOSA; PAULA, 2015).

A enxertia de cadeias poliméricas em polímeros naturais ou em outros substratos pode ser realizada seguindo três abordagens diferentes; *grafting from*, *grafting to* e *grafting through*, com as duas primeiras abordagens sendo as mais

usadas (VALDEZ; CHAMPAGNE; CUNNINGHAM, 2018).

Figura 4 - Representação de modificação de polissacarídeo *via* a) *grafting from*; b) *grafting to* e c) *grafting through*



Fonte: Adaptada de Valdez, Champagne e Cunningham (2018)

O *graft from* (Figura 4a) também é conhecido como copolimerização iniciada pela superfície. É geralmente usado quando maiores densidades de enxertia são desejadas. As cadeias poliméricas crescem a partir da superfície do substrato, que primeiro tem que ser funcionalizado com um iniciador antes de realizar a copolimerização na presença do monômero desejado. No *graft to* (Figura 4b), as cadeias poliméricas são sintetizadas antes de estarem ligados à superfície do substrato ou ao esqueleto do polímero; o substrato deve possuir grupos funcionais capazes de reagir com o grupo funcional terminal dos polímeros sintetizados. Na abordagem do *graft through* (Figura 4c) uma cadeia polimérica funcionalizada com grupos terminais vinílicos é copolimerizada com outros monômeros, produzindo copolímeros (HADJICHRISTIDIS *et al.*, 2006; VALDEZ; CHAMPAGNE; CUNNINGHAM, 2018).

A enxertia *via grafting from* tem sido bastante relatada na literatura. As reações são realizadas principalmente por polimerização via radicais livres (DENG *et al.*, 2015; KEKEZ *et al.*, 2016; CHUMACHENKO *et al.*, 2017).

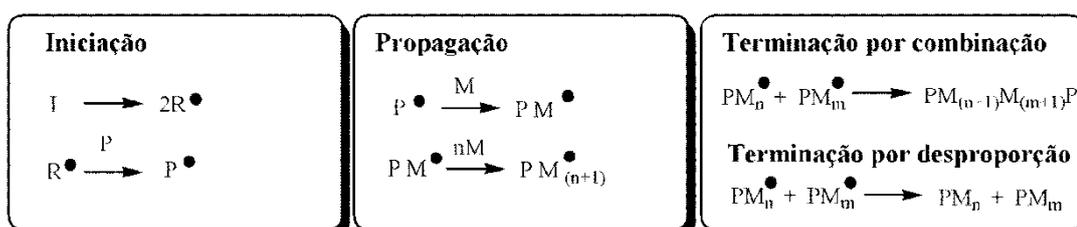
1.7 Polimerização via radicais livres

A polimerização por radicais livres é o método típico de polimerização por enxertia de vários monômeros em polímero existente. Ela é iniciada quimicamente ou por radiação (PARIDA *et al.*, 2015). Durante a polimerização, a formação de radical para as reações de iniciação pode ocorrer tanto no polímero de base como no monômero a ser enxertado (MAHDAVINIA; ZOHURIAAN-MEHR; POURJAVADI, 2004).

Em uma reação de polimerização por radicais livres, o aumento da concentração de iniciador leva a uma redução da massa molar. Além disso, os radicais livres podem levar à degradação da cadeia de polissacarídeos. No entanto, esses efeitos dependem da interação entre o iniciador, o monômero e o polissacarídeo (MARQUES *et al.*, 2016).

A polimerização em cadeia consiste em uma sequência de três etapas - iniciação, propagação e terminação. Considera-se que o passo de iniciação envolve duas etapas: a dissociação do catalisador e a adição deste radical à primeira molécula de polissacarídeo para produzir o radical de iniciação da cadeia (P^\bullet). O radical (R^\bullet) é frequentemente chamado de radical iniciador ou radical primário para distingui-lo das espécies iniciadoras da cadeia (P^\bullet). Propagação consiste no crescimento de M^\bullet pelas adições sucessivas de grande número de moléculas monoméricas. Em algum momento, a cadeia polimérica de propagação para de crescer e termina. A terminação com a aniquilação dos centros radicais ocorre por reação bimolecular entre radicais. Dois radicais reagem um com o outro pela combinação (acoplamento) ou, mais raramente, pela desproporção, na qual um radical de hidrogênio que é *beta* para um centro radical é transferido para outro centro radical (ODIAN, 2004), representado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema geral das etapas da polimerização radicalar de um monômero vinílico (M) em um polissacarídeo (P), iniciada pela espécie I



Fonte: Adaptado de Moad e Solomon (2006)

O persulfato de potássio tem sido utilizado como iniciador em síntese de copolímeros por enxertia à base de polissacarídeos (MARQUES *et al.*, 2016; YILMAZ *et al.*, 2016; EL-HAMSHARY *et al.*, 2015).

Diante do exposto este trabalho tem como objetivo estudar a enxertia da N-isopropilacrilamida em sulfato de dextrana a fim de se obter nanopartículas auto-organizadas e termorresponsivas que tenham capacidade de encapsular MTX.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de sulfato de dextrana (DS) enxertada com poli(N-isopropilacrilamida) para uso como matriz na incorporação de metotrexato no tratamento da Artrite Reumatoide.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da razão molar de sulfato de dextrana/N-isopropilacrilamida na formação dos copolímeros;
- Caracterizar o sulfato de dextrana e a poli (N-isopropilacrilamida) por análise elemental, FTIR, RMN, DLS, GPC, TGA e DSC;
- Investigar as propriedades dos copolímeros através das técnicas de FTIR, RMN, CAC, DLS, GPC, TGA, DSC e MEV;
- Determinar a estabilidade das nanopartículas em solução tampão fosfato simulando o meio fisiológico;
- Avaliar a capacidade de incorporação do fármaco metotrexato às nanopartículas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O sulfato sódico de dextrana (DS) de massa molar 5×10^5 g/mol foi adquirido da Serva. O N-isopropilacrilamida (NIPAM) usado como monômero sintético, o persulfato de potássio (KPS) e o N,N,N',N'-Tetrametileno-diamino (TEMED), utilizados como iniciadores, foram adquiridos da Sigma Aldrich®. Acetona, fosfato de potássio monobásico anidro, fosfato de sódio dibásico foram adquiridos da Vetec®. O hidróxido de sódio foi oriundo da Synth® e a Pululana (P-82) foi adquirida da Shodex.

3.2 Síntese e purificação dos copolímeros

A síntese, utilizando o iniciador KPS, baseou-se na metodologia descrita por Shi e Zhang (2007) com modificações. Foram dissolvidos 500 mg de DS em 100 mL de água destilada sob atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente (25 °C) por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado ao sistema reacional o iniciador KPS com razão molar 7:1 (DS/KPS), juntamente com TEMED em uma razão molar 1:1 (KPS/TEMED). Após 20 minutos, foi adicionado NIPAM para a formação do copolímero. O sistema foi mantido a temperatura ambiente em atmosfera inerte por 4 h. A solução resultante foi colocada em diálise contra água destilada até que a condutância da água residual estivesse próxima à da água destilada. Foi necessário um período de 2 dias, realizando trocas de água em intervalos de 12 horas. Em seguida, o material foi liofilizado. Na sequência, os copolímeros foram dispersos em acetona sob agitação magnética (300 rpm) por 24 h para dissolver o homopolímero que pode ter sido formado durante a reação de enxertia. Por fim, os copolímeros foram centrifugados sob rotação de 6000 rpm durante 20 minutos. O precipitado foi recolhido e redissolvido em água destilada para posterior liofilização.

Foram realizadas três sínteses diferentes variando a razão molar DS/NIPAM. A concentração de iniciador foi mantida constante em todas as reações. Os copolímeros obtidos foram nomeados de DS-g-PNIPAM, DS-g-2PNIPAM e DS-g-

3PNIPAM. O número a frente da sigla PNIPAM significa o número de mols do NIPAM adicionados por mol de DS.

O rendimento reacional do copolímero não purificado (RCNP) e o rendimento reacional do copolímero purificado (RCP) foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2:

$$RCNP (\%) = \frac{\text{massa de copolímero não purificado}}{\text{massa inicial de (DS + NIPAM)}} \times 100 \quad (1)$$

$$RCP (\%) = \frac{\text{massa de copolímero purificado}}{\text{massa inicial de (DS + NIPAM)}} \times 100 \quad (2)$$

3.3 Incorporação do Metotrexato

Para a incorporação do MTX, foram utilizados 8 mL da solução de copolímero na concentração de 1 mg/mL, acrescidos de 2 mL da solução do fármaco na concentração de 1 mg/mL, totalizando um volume final de 10 mL. A concentração foi de 20% em massa de MTX com relação a massa do copolímero. As duas soluções foram preparadas em DMSO. Essa solução de copolímero/MTX foi gotejada em 20 mL de água destilada a 37 °C para formação das nanopartículas. Esta solução foi lentamente adicionada em 50 mL de água destilada e mantida durante 10 minutos em contato sob lenta agitação. Posteriormente, a solução final foi dialisada contra água destilada por 48 horas a fim de remover o DMSO, com trocas de água a cada 24 horas e, em seguida, liofilizada.

3.3.1 Determinação da Eficiência de encapsulamento e Conteúdo de fármaco do MTX

A quantificação do MTX nas nanopartículas foi realizada utilizando DMSO para a extração do fármaco. Essa análise foi realizada utilizando espectrofotômetro UV-visível SHIMADZU UV-1800, com a seguinte curva de calibração:

$$ABS = 0,0275 + 52,35 \times C \quad (3)$$

onde C é a concentração de MTX em mg/mL

A Eficiência de Encapsulamento (EE) e o Conteúdo de Fármaco (CF) foram determinados através das equações 4 e 5:

$$EE(\%) = \frac{\text{Massa de farmaco extraído da nanopartícula}}{\text{Massa inicial de fármaco}} \times 100 \quad (4)$$

$$CF(\%) = \frac{\text{Massa de farmaco extraído da nanopartícula}}{\text{Massa de copolímero}} \times 100 \quad (5)$$

3.4 Caracterização dos copolímeros

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

O DS e os copolímeros foram caracterizados por FTIR a fim de confirmar a presença das bandas características do DS e comprovar a reação de enxertia com o NIPAM. As amostras foram analisadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro Shimadzu modelo IRTracer100 na região entre 4000 e 400 cm^{-1} .

3.4.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

O volume de eluição foi determinado por cromatografia de permeação em gel através de um cromatógrafo Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A). Foi utilizada a coluna PolySep linear (7,8 por 300 mm) e NaNO_3 (aq) 0,1 mol/L como fase móvel, à temperatura de 25 °C e fluxo de 1 mL/min. O volume injetado das amostras foi de 50 μL .

Pululana foi utilizada como padrão, sendo a equação da curva padrão:

$$\text{Log}M_p = 14,41 - 1,1392V_e \quad (6)$$

Onde M_p é a massa molar de pico e V_e é o volume de eluição

3.4.3 Análise Elementar (CHNS)

Os teores de nitrogênio, hidrogênio, carbono e enxofre do DS e dos copolímeros foram determinados por microanálise elementar utilizando o equipamento Series II CHNS/O Analyzer da PerkinElmer.

3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises dos copolímeros e do PNIPAM por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e do DS por (¹H -¹³C HSQC) foram realizadas no equipamento Bruker Modelo Avance DRX500, com controle de temperatura, de 25 e 70 °C utilizando como padrão o ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS). As amostras foram preparadas em água deuterada (D₂O).

3.4.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA do polissacarídeo e dos copolímeros foi realizada em equipamento Q-50 TA em atmosfera de nitrogênio com um fluxo de 50 mL/min. Foi usada uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de 25 °C a 950 °C. Foram utilizados, aproximadamente, 8,0 mg em cadinho de platina.

3.4.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas em equipamento SHIMADZU DSC-50 sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Foram utilizados 4,0 mg de amostra em cadinho de alumina, na faixa de temperatura de 25 a 600 °C a uma razão de aquecimento de 10 °C/min.

3.5 Caracterização das nanopartículas obtidas

3.5.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

As medidas foram obtidas por espalhamento de luz dinâmico com espalhamento não invasivo em contracorrente (DLS-NIBS) no intervalo de 25 a 50 °C após incidir um laser vermelho (633 nm) na amostra com detecção em um ângulo de 173°. O potencial zeta dos copolímeros foi medido por velocimetria de Doppler a laser misto e análise de fase de troca de luzes (M3 - PALS). Um Nanosizer

ZS 3600 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) foi utilizado para ambas as determinações.

A temperatura em que há a transição de fase do copolímero e a consequente formação dos agregados auto-organizados (LCST – *lower critical solution temperature*) foi estudada pela determinação do diâmetro hidrodinâmico dos copolímeros em solução aquosa (1 mg/mL) em função da temperatura, no intervalo de 25 a 50 °C.

As soluções foram aquecidas no próprio equipamento em cubeta de vidro e o tamanho de partícula foi analisado a cada aumento de 1 °C, com tempo de equilíbrio de 4 min antes de cada análise. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.2 Concentração de associação crítica (CAC)

A determinação da CAC por fluorescência foi realizada baseada no procedimento proposto por Patrizi et al. (2009). A solução aquosa de pireno usada nas medidas (5×10^{-7} mol/L) foi preparada pela adição de 50 µL de uma solução 5×10^{-4} mol/L de pireno/acetona em um balão volumétrico de 500 mL. A acetona foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e o volume foi completado com água deionizada.

A concentração de associação crítica (CAC) foi determinada em um espectrofluorímetro RF-6000 Shimadzu, com uma largura de banda de 5,0 nm. O espectro de excitação de fluorescência (320-350 nm) dos copolímeros utilizando o pireno como sonda foi obtido usando comprimento de onda de emissão em 374 nm. A razão de intensidades (I_{338}/I_{334}) foi usada para determinar a concentração de associação crítica.

A solução aquosa de pireno 5×10^{-7} mol/L foi utilizada para preparar as soluções dos copolímeros (DS-g-PNIPAM e DS-g-3PNIPAM) nas concentrações de 10^{-3} a 1 mg/mL. As medidas foram feitas a 25 e a 50 °C em triplicata.

3.5.3 Estabilidade em tampão fosfato (pH 7,4)

O diâmetro médio e o índice de polidispersão foram analisados como parâmetros de estabilidade das nanopartículas. Esses dois parâmetros foram investigados nas nanopartículas a temperatura de 37 °C em uma solução de tampão fosfato (PBS) 0,1 mol/L, pH 7,4.

O ensaio foi realizado durante um período de 72 horas mantendo-se a temperatura em 37 °C. As medidas foram realizadas em tempos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 12; 24; 48 e 72 h. A concentração utilizada dos copolímeros foi de 1mg/mL em cubeta de vidro no equipamento Nano Zetasizer da Malvern modelo ZS 3600.

3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As nanopartículas foram estudadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura. Foi preparada uma solução 0,1 mg/mL do copolímero e deixada sobre agitação durante 24 horas. Posteriormente, a solução foi gotejada sobre a fita de carbono e deixada para evaporar na temperatura de 37 °C em estufa. Em seguida, a amostra foi recoberta de ouro utilizando o Metalizador Quorum QT150ES. O estudo foi feito em um equipamento de Microscópio de Varredura FEG Quanta 450 ambiental, da Central Analítica da UFC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos copolímeros

Os rendimentos reacionais dos copolímeros não purificados (RCNP) e dos copolímeros purificados (RCP) estão apresentados na Tabela 2. A redução do RCP pode ser explicada pela natureza do polissacarídeo de partida. O DS comercial utilizado nas sínteses apresenta um grau de sulfatação 2, ou seja, cada unidade glicosídica tem em média 2 grupamentos sulfato. Eles podem causar um maior impedimento estérico, dificultando a enxertia de NIPAM, e levando a reação preferencial de homopolimerização (PNIPAM) em competição com a enxertia. Porém, o RCP dos copolímeros que apresentam razões molares DS/PNIPAM 1:1, 1:2 e 1:3 não variou significativamente. Nas 3 razões estudadas deve ocorrer preferência pela continuidade da propagação reacional nas unidades de NIPAM enxertados, ocasionando um prolongamento da cadeia polimérica enxertada. O esquema reacional proposto pode ser verificado na Figura 6.

Tabela 2 - Os rendimentos reacionais dos copolímeros não purificados e purificados

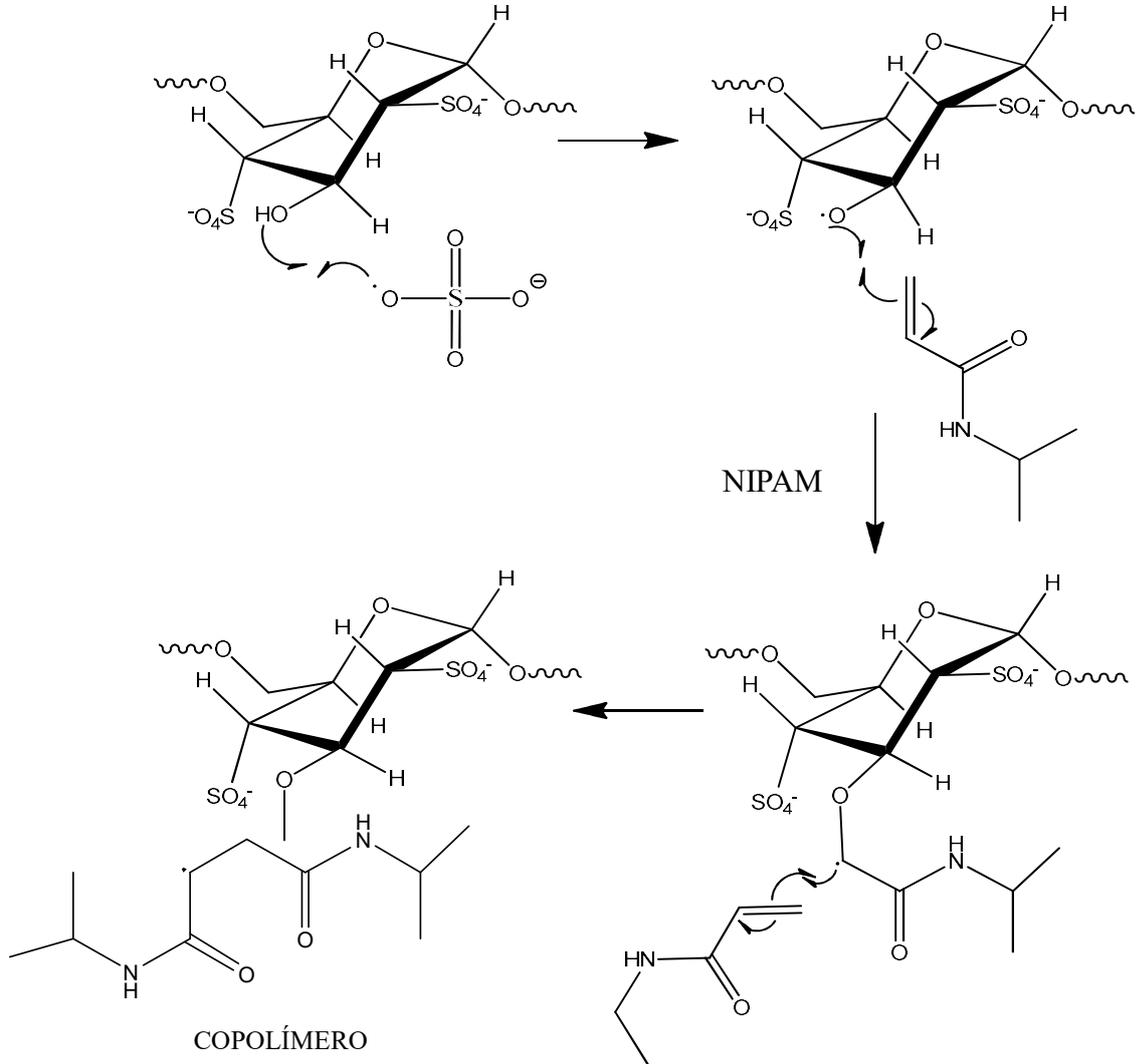
Copolímeros	RCNP (% m/m)	RCP (%m/m)	Homopolímero (%m/m)
DS-g-PNIPAM	86,6 ± 2,4	53,0 ± 0,9	~ 33,5
DS-g-2PNIPAM	82,1 ± 1,9	50,3 ± 1,2	~ 31,8
DS-g-3PNIPAM	86,4 ± 2,2	49,1 ± 1,4	~ 37,4
DS-KPS	62,0	-	-

Fonte: Dados da pesquisa

Para verificar se a perda de massa estava relacionada apenas à ineficiência do sistema reacional, realizou-se uma síntese sem a adição do NIPAM, mas com todos os outros componentes e nas mesmas condições da síntese dos copolímeros. Ocorreu uma expressiva perda de massa, com rendimento calculado pós-diálise de 62%. Durante o processo reacional poderá ocorrer a degradação da cadeia polimérica do DS devido aos radicais formados, como também verificado nos trabalhos de Liu e Sun (2008). O mecanismo da suposta degradação é a abstração do hidrogênio anomérico promovido pelo radical sulfato, seguido da cisão da ligação

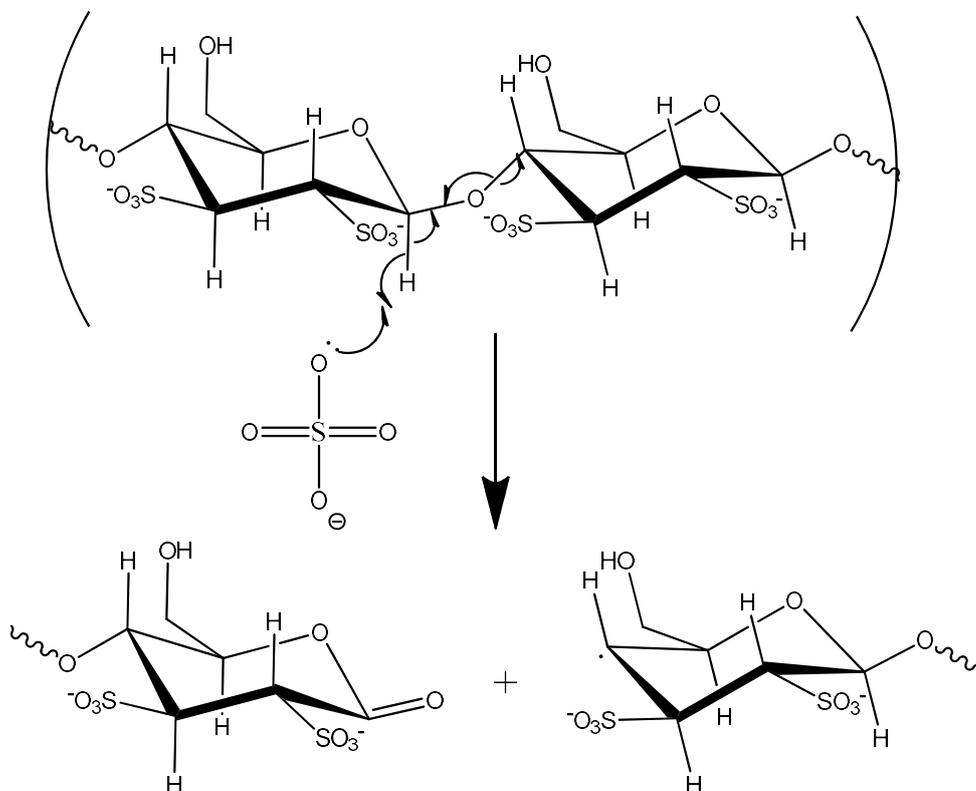
glicosídica, ilustrada na Figura 7.

Figura 6 - Proposta esquemática da reação de síntese do copolímero DS/PNIPAM.



Fonte: O autor.

Figura 7 - Proposta mecanística da degradação da cadeia polimérica do DS promovida pelo sistema de iniciação KPS/TEMED.



Fonte: Adaptada de Liu e Sun (2008).

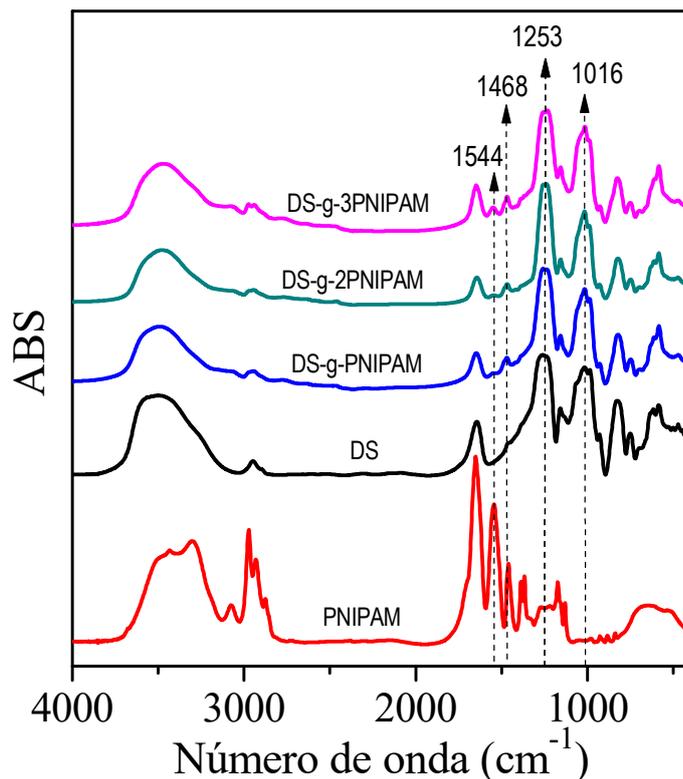
4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos materiais de partida e dos copolímeros estão apresentados na Figura 8. É possível observar banda de absorção em 3508 cm^{-1} , relativa ao estiramento O–H; em 2949 cm^{-1} atribuída ao estiramento C–H de CH_2 ; em 1653 cm^{-1} devido à deformação angular H–O–H referente à unidade do polissacarídeo; em 1257 cm^{-1} , referente ao estiramento simétrico S=O, e bandas entre 1200 e 1000 cm^{-1} , características do estiramento C–O–C da ligação glicosídica do sulfato de dextrana. Em 985 e 822 cm^{-1} , apareceram bandas de estiramento assimétrico S=O e estiramento O–S–O (LAMICHHANE *et al.*, 2015). No PNIPAM, as bandas em 2971 e 1651 cm^{-1} estão associadas ao estiramento C–H do grupo isopropil, e ao estiramento da ligação C=O do grupo amida (-CONH-) (banda de amida I), respectivamente. A banda em 1544 cm^{-1} é atribuída à vibração de deformação de N–H do grupo amida e em 1468 cm^{-1} à deformação angular C–N

(ABREU *et al.*, 2016).

As bandas características utilizadas para confirmar a enxertia do PNIPAM nos copolímeros foram 1544 cm^{-1} ($\delta\text{N-H}$) e 1468 cm^{-1} ($\delta\text{C-N}$). A presença do DS foi confirmada pelas bandas em 1257 cm^{-1} ($\nu_s\text{S=O}$) e 1016 cm^{-1} ($\nu_s\text{C-O-C}$).

Figura 8 - Espectros de FTIR dos copolímeros e materiais de partida



No intuito de verificar se a intensidade das bandas sofreria influencia com o aumento do teor de NIPAM no meio reacional, foi realizada a integração das bandas em 1544 cm^{-1} e 1468 cm^{-1} , provenientes do PNIPAM e em 1016 cm^{-1} referente ao DS. Posteriormente, os sinais foram correlacionados e os resultados estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Área das bandas em 1544, 1468 e 1016 cm^{-1} no espectro de absorção na região do infravermelho dos copolímeros

Copolímeros	1544 cm^{-1}	1468 cm^{-1}	1016 cm^{-1}	A_{1544}/A_{1016}	A_{1468}/A_{1016}
DS-g-PNIPAM	1,13	5,84	112,54	0,010	0,052
DS-g-2PNIPAM	1,27	6,39	99,62	0,013	0,064
DS-g-3PNIPAM	5,21	7,95	111,82	0,047	0,071

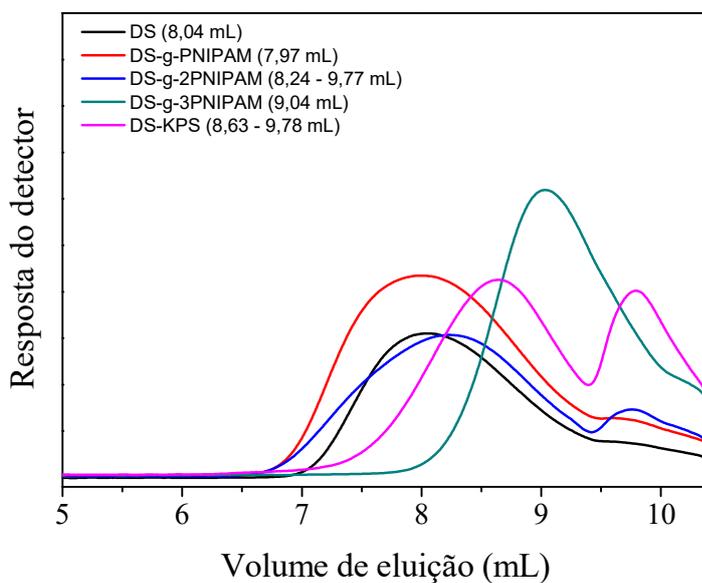
Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados mostram que o aumento da relação molar PNIPAM/DS pode ser correlacionado à intensidade relativa das bandas provenientes do PNIPAM, em 1544 e 1468 cm^{-1} , sendo mais pronunciadas no copolímero DS-g-3PNIPAM.

4.2 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Analisando o volume de eluição no pico nos cromatogramas apresentados na Figura 9, pode-se observar que os copolímeros apresentam maiores volumes de eluição do que o do DS. Com a enxertia das cadeias de PNIPAM, a modificação esperada era uma diminuição do volume de eluição. Esse comportamento se intensifica à medida que a razão molar PNIPAM/DS aumenta, mesmo mantendo o sistema de iniciação constante. Uma possível explicação é que o aumento da razão PNIPAM/DS promove um maior envelhecimento da cadeia polimérica, visto que as interações são intensificadas devido ao aumento da enxertia do PNIPAM, podendo ocasionar uma agregação e conseqüente diminuição do volume hidrodinâmico. Resultados similares foram registrados nos trabalhos de Hufendiek *et al.* (2014). Para o DS-g-2PNIPAM foi observado um comportamento bimodal, com o aparecimento de um segundo pico no volume de 9,8 mL, possivelmente um indicativo de degradação, que também foi observado na síntese DS-KPS.

Figura 9 - Cromatogramas do DS e copolímeros



Fonte: Dados da pesquisa

Os volumes de eluição (V_e) dos copolímeros e do DS estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores dos volumes de eluição dos copolímeros

Amostras	Volume de eluição (mL)
DS	8,0
DS-g-PNIPAM	8,0
DS-g-2PNIPAM	8,2 e 9,8
DS-g-3PNIPAM	9,0
DS-KPS	8,6 e 9,8

Fonte: Dados da pesquisa

4.4 Análise elementar (CHNS)

Utilizando análise elementar pôde-se determinar o teor de PNIPAM presente nos copolímeros. Relacionou-se o teor de nitrogênio (%N), oriundo da inserção dos grupos NIPAM - única fonte de nitrogênio, com a sua massa molar (Equação 4) (ZHANG *et al.*, 2011), modificada para relação com NIPAM.

$$\%PNIPAM = \frac{\%N \cdot 113}{14} \quad (7)$$

onde: 14 g/mol é a massa atômica do nitrogênio e 113 g/mol é a massa molar do NIPAM

Os dados da Tabela 5 mostram que as razões molares DS-g-PNIPAM e DS-g-2PNIPAM não apresentam uma variação significativa em relação ao teor de PNIPAM, que pode ser explicado devido ao aparecimento de duas espécies de massas molares distintas. Entretanto, o copolímero DS-g-3PNIPAM passa a mostrar um aumento da enxertia de PNIPAM.

Tabela 5 - Teores de carbono, nitrogênio, enxofre e PNIPAM presentes nos copolímeros e valores de grau de substituição.

Amostras	%C	%N	%S	PNIPAM (%m)	Proporção em mol (PNIPAM:DS)
DS	15,6 ± 0,1	-	14,2 ± 0,1	-	-
DS-g-PNIPAM	19,9 ± 0,8	2,1 ± 0,1	11,1 ± 0,2	16,9 ± 0,8	7:10
DS-g-2PNIPAM	20,3 ± 0,4	2,3 ± 0,1	11,0 ± 0,3	18,6 ± 0,3	7:10
DS-g-3PNIPAM	23,9 ± 0,3	3,6 ± 0,2	11,0 ± 0,2	29,1 ± 1,1	12:10

Fonte: Dados da pesquisa

Realizando uma comparação com o rendimento reacional, o resultado corrobora com a proposta de prolongamento da cadeia de PNIPAM, pois o grau de enxertia aumenta no copolímero DS-g-3PNIPAM, mesmo com o impedimento promovido pelos grupamentos sulfato.

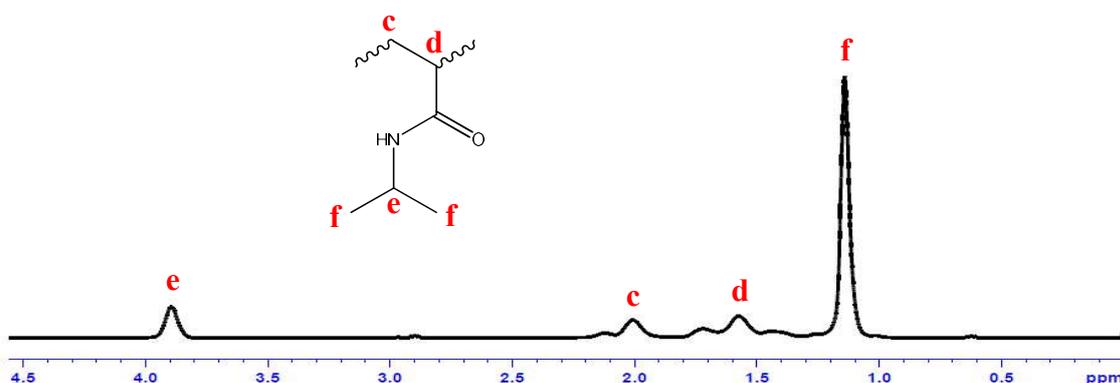
4.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A utilização do RMN ¹H teve como objetivo a confirmação da enxertia de cadeias de PNIPAM na estrutura polimérica do polissacarídeo. A análise do DS foi realizada por ¹H – ¹³C HSQC na temperatura de 70 °C para que os sinais referentes ao polissacarídeo fossem mais evidenciados. Entretanto, para o homopolímero e os copolímeros foi necessária a utilização da temperatura de 25 °C, devido à formação da nanopartículas após a LCST. Na LCST, ocorre a contração dos segmentos

hidrofóbicos com a formação do núcleo. O polissacarídeo, segmento hidrofílico, atuaria como a coroa que recobriria a nanopartícula, dificultando a percepção dos sinais referentes aos grupos PNIPAM da estrutura. Comportamento similar também foi observado para os copolímeros de celulose-g-PNIPAM (YANG *et al.*, 2015) e para copolímeros de goma de cajueiro-g-PNIPAM (ABREU *et al.*, 2016).

Os deslocamentos químicos (δ ppm) correspondentes de ^1H do PNIPAM, citados pela literatura, são os seguintes: 3,98 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) (**e**), 2,17 ($-\text{CH}-\text{CH}_2$) (**c**), 1,66 ($-\text{CH}-\text{CH}_2$)(**d**) e 1,15 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)(**f**) (LUO *et al.*, 2012). Os valores foram próximos aos resultados obtidos no espectro da Figura 10, onde δ 3,89 em (**e**), δ 2,12em (**c**), δ 2,01 em (**d**) e δ 1,14 em (**f**).

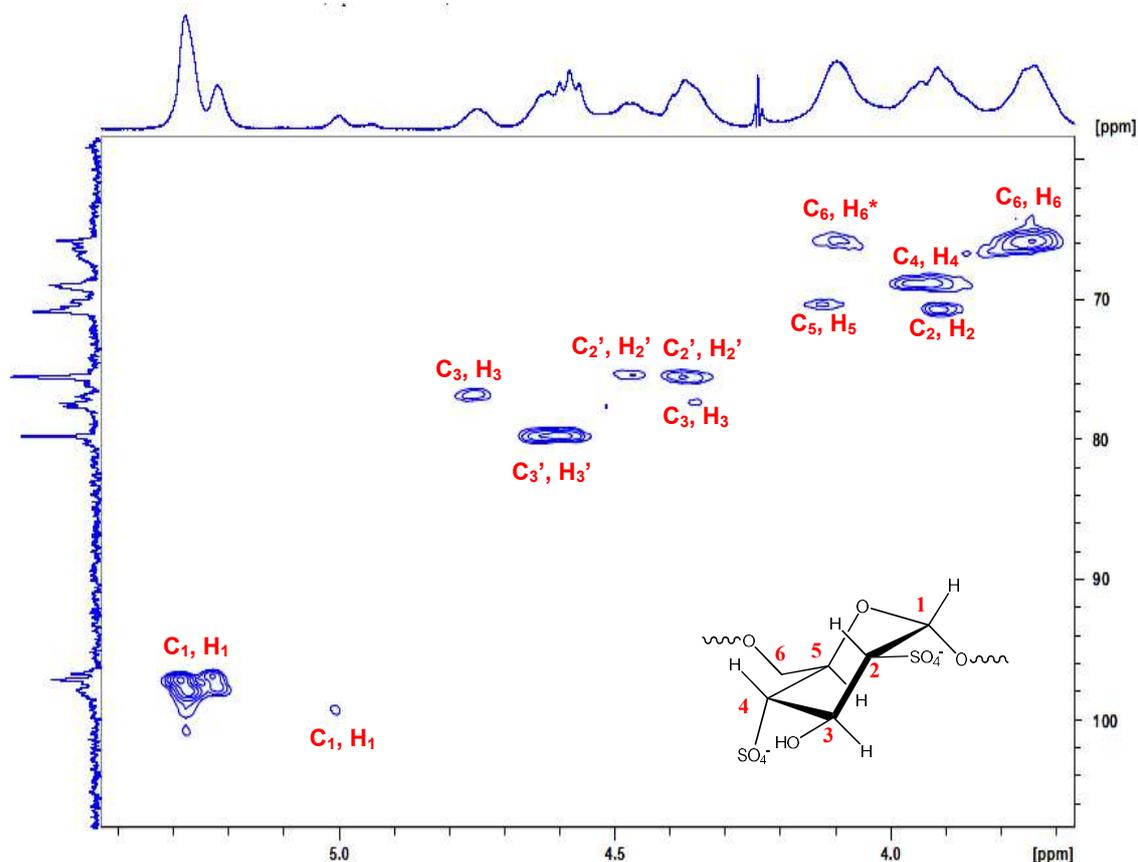
Figura 10 - Espectro de ^1H do PNIPAM



Fonte: Dados da pesquisa

Os sinais referentes ao DS podem ser observados no espectro bidimensional, apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Espectro de HSQC do DS com grau de sulfatação 2



A correlação dos carbonos e prótons para o DS é mostrada na Tabela 6. A correlação do C1/H1, para o DS é mais intensa em δ 97,20/5,29 e em δ 96,89/5,24, sendo mais desprotegidos devido a presença de grupos sulfato na posição 2. A distribuição dos sulfatos na cadeia polissacarídica influencia o aparecimento de sinais em deslocamentos químicos distintos. A correlação de C2/H2 para sulfato na posição 2 apresenta um deslocamento superior a mesma posição não substituída. Em δ 75,52/4,38 e em δ 75,37/4,48 para a posição substituída e para a posição não substituída δ 70,72/3,97. A presença de dois sinais C6/H6 pode ser referente à presença de hidrogênios diastereotópicos em ambientes químicos diferentes em δ 65,77/3,75 e em δ 65,77/4,10. Para C3/H3 com a presença de sulfato na posição 2 e 4 apresenta um valor de deslocamento δ 79,70/4,60 (MAHNER; LECHNER; NORDMEIER, 2001).

Tabela 6 - Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HSQC do DS

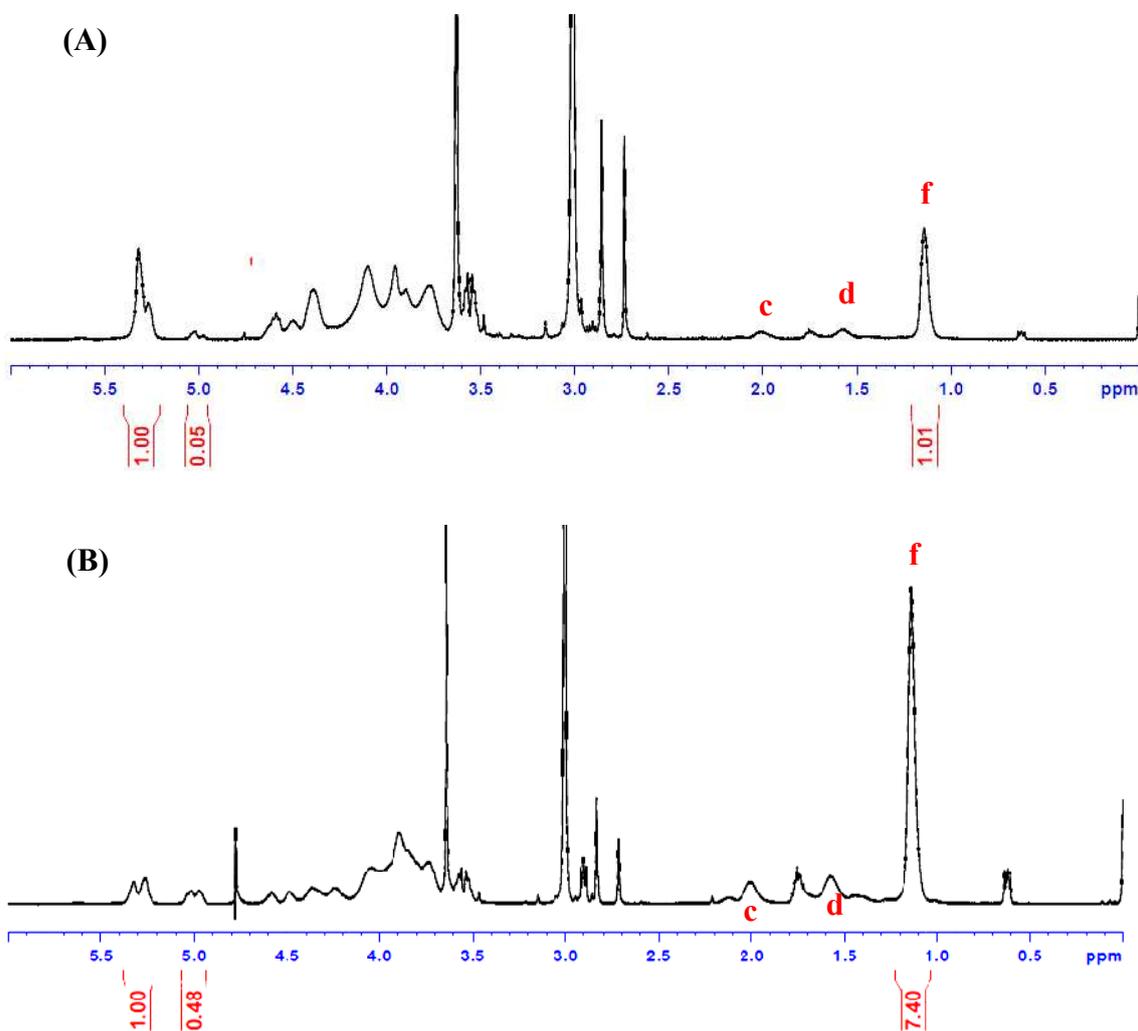
ATRIBUIÇÃO	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
C1/H1 com substituição na posição 2	97,20	5,29
C1/H1 com substituição na posição 2	96,89	5,24
C1/H1sem substituição na posição 2	99,37	5,01
C3'/H3' com substituição nas posições 2 e 4	79,70	4,60
C3/H3	77,53	4,53
C3/H3	77,38	4,36
C2'/H2' substituído	75,52	4,38
C2'/H2'substituído	75,37	4,48
C2/H2	70,72	3,97
C5/H5	70,26	4,13
C4/H4	68,87	3,96
C6/H6*	65,77	4,10
C6/H6	65,77	3,75

*Diasterotópico

Fonte: Dados da pesquisa

Três deslocamentos químicos atribuídos ao PNIPAM (hidrogênios **c**, **d** e **f** da Figura 10) podem ser observados claramente nos espectros dos copolímeros na Figura 12, confirmando assim a modificação. O deslocamento referente ao hidrogênio não foi observado porque o mesmo está sobreposto aos sinais do DS.

Figura 12 - Espectros de RMN H^1 dos copolímeros DS-g-PNIPAM em (A) e DS-g-3PNIPAM em (B)



Na estrutura química dos copolímeros DS-g-PNIPAM e DS-g-3PNIPAM, a diferença nas áreas dos picos referentes à PNIPAM e ao DS indicam que a quantidade de NIPAM inserida na cadeia do sulfato de dextrana foi maior para o copolímero DS-g-3PNIPAM em relação ao DS-g-PNIPAM, que pode ser aferidos através da Equação 8.

$$SM = \frac{\left(\frac{F}{6}\right)}{A} \quad (8)$$

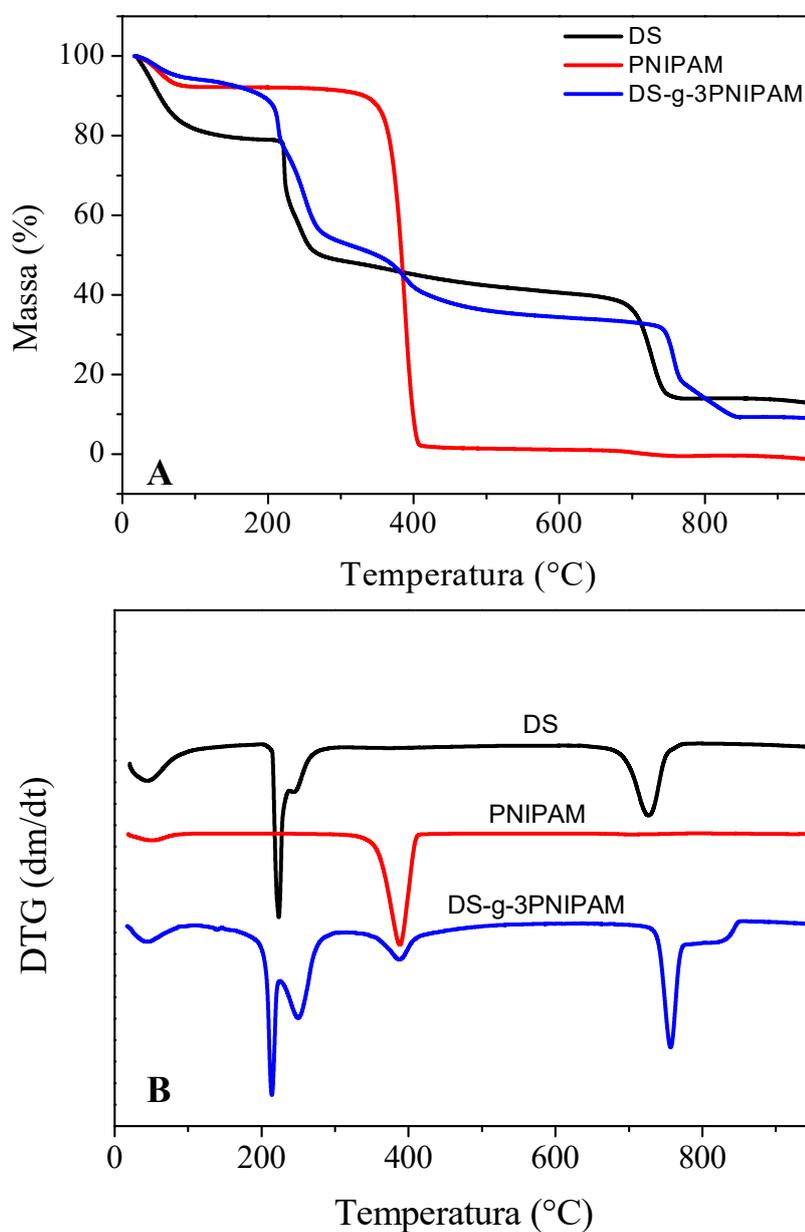
onde: **SM** é o grau de substituição molar, **F** é a área do pico em δ 1,14 ppm proveniente dos dois grupamentos CH_3 nos copolímeros, com um total de 6 hidrogênios e **A** é a área do hidrogênio anomérico da cadeia do DS.

Os valores obtidos para o DS-g-PNIPAM e DS-g-3PNIPAM são 0,16 e 0,83, respectivamente. Essa maior enxertia também foi confirmada por FTIR e análise elementar.

4.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento térmico do DS, PNIPAM e do copolímero DS-g-3PNIPAM foi estudado por TGA (Figura 13).

Figura 13 - TGAs (A) e DTGs (B) dos materiais de partida e do copolímero DS-g-3PNIPAM em atmosfera de nitrogênio



Fonte: Dados da pesquisa

Os valores de temperatura obtidos dos eventos de degradação, a perda de massa e o resíduo obtido na temperatura final da faixa analisada podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de estabilidade térmica do DS, PNIPAM e do copolímero DS-g-3PNIPAM.

Amostra	Eventos de Degradação	T _{pico} (°C)	Perda de Massa (%)	Resíduo (%)
DS	I	45	20,6	12,9
	II	223	19,8	
	III	244	11,5	
	IV	728	24,7	
PNIPAM	I	52	7,5	0,0
	II	388	89,7	
DS-g-3PNIPAM	I	44,4	6,0	9,0
	II	214	18,1	
	III	250	22,4	
	IV	388	13,9	
	V	757	16,0	
	VI	776	7,9	

Fonte: Dados da pesquisa

Observa-se que o início da degradação térmica do copolímero ocorre em temperatura superior a 121 °C, temperatura usada para a esterilização de produtos farmacêuticos (ABREU *et al.*, 2016). Isso indica que o DS-g-3PNIPAM poderá ser esterilizado sem modificação estrutural.

O copolímero apresenta cinco eventos de degradação, em que o evento I corresponde à perda de água. O evento II ocorre em temperatura inferior ao mesmo sinal observado no DS. Este fato pode ser justificado pela modificação estrutural ocasionada pela incorporação do NIPAM, efeito também observado nos trabalhos de Rosca *et al.* (2011).

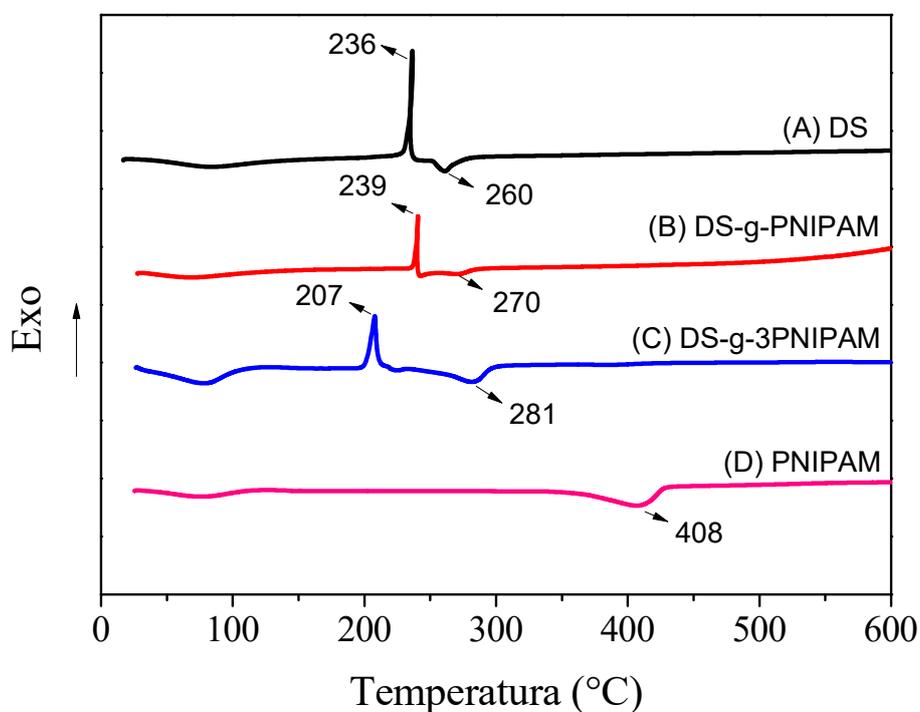
O evento III no copolímero também é referente ao DS, apresenta pequena variação de temperatura (6 °C) e seu perfil é modificado. Entretanto, pode-se observar uma variação significativa na perda de massa referente a esse evento, no DS, $\Delta m = 11,5\%$, e no copolímero $\Delta m = 22,4\%$. O evento IV, observado no copolímero, é referente à degradação do PNIPAM. O evento V é promovido por outro

evento de degradação do DS, mas a temperatura no copolímero é 29 °C superior à do material de partida. Já o evento VI é inexistente no DS e no PNIPAM, devendo ser relativo à degradação do copolímero.

4.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As variações de entalpia dão origem à formação de picos que podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 - Curvas de DSC do DS, PNIPAM e dos copolímeros.



Fonte: Dados da pesquisa

Os eventos endotérmicos originados até a temperatura de 100 °C são provenientes da perda de água associada a grupos hidrofílicos dos compostos. Em (A), ocorre o aparecimento de um evento exotérmico em 236 °C, referente à temperatura de cristalização (T_c) com $\Delta H = +129,4$ J/g e um endotérmico em 260 °C com $\Delta H = -96,2$ J/g, associado à temperatura de fusão (T_m). Valor menor de temperatura (T_c = 210 °C) e valor superior de T_m (272 °C) foram observados para o DS por Lamichhane *et al.* (2015). Para o copolímero DS-g-PNIPAM, a T_c foi registrada em 239 °C com $\Delta H = +132,9$ J/g, variação pouco significativa. Já a T_m

sofreu uma elevação e um aumento de entalpia, apresentando um valor de 270 °C com $\Delta H = -57,5$ J/g. Para o DS-g-3PNIPAM a T_c foi de 207 °C com $\Delta H = +188,5$ J/g e a T_m foi elevada para 280 °C com $\Delta H = -142,3$ J/g.

O evento endotérmico apresenta um deslocamento para temperaturas mais elevadas à medida que a razão molar PNIPAM/DS aumenta. Isso pode evidenciar que a enxertia de PNIPAM ocasiona um aumento das interações. Uma maior organização das cadeias poliméricas, eleva a energia necessária para fundir o copolímero formado, quando comparado ao DS. As variações de entalpia são mais pronunciadas no copolímero DS-g-3PNIPAM, onde as entalpias de cristalização e fusão apresentam um aumento de 59,1 J/g e 46,1 J/g, respectivamente. Essa observação pode evidenciar um aumento de rigidez do material através da adição das cadeias de PNIPAM.

O evento na temperatura de 408 °C, referente ao PNIPAM, não é evidenciado nos copolímeros. Isso significa que o perfil da curva não é apenas uma superposição das curvas do DS e do PNIPAM, ou seja, uma mistura física. As novas ligações formadas na cadeia principal do copolímero ocasionam uma modificação estrutural, e essa modificação reflete nos resultados observados de entalpia, apresentando-se como evidência da produção de um novo material.

4.8 Nanopartículas via auto-organização

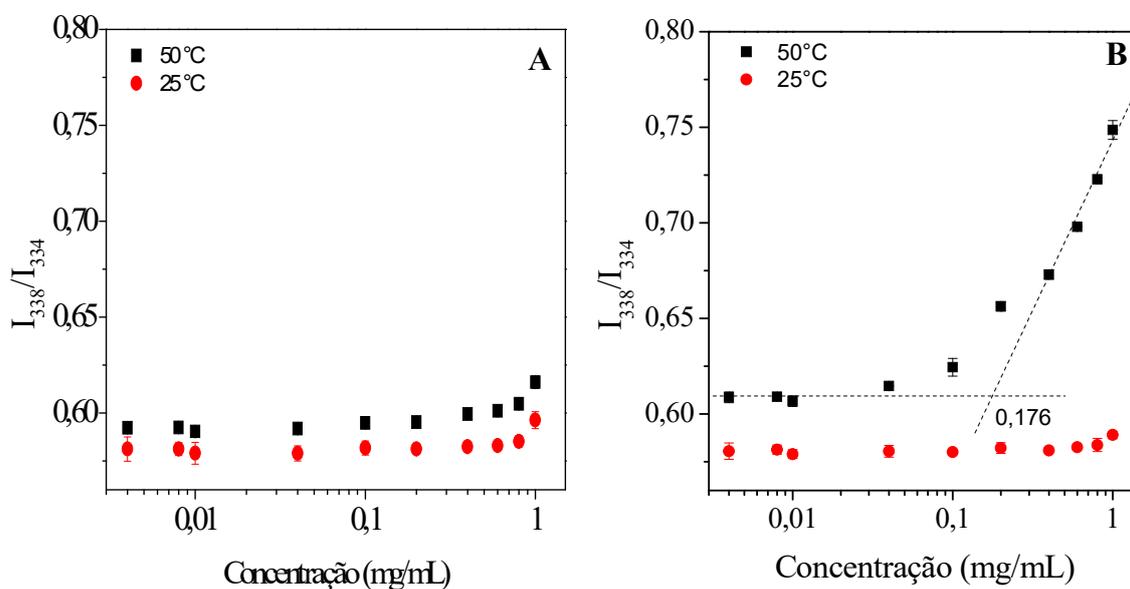
4.8.1 Concentração de associação crítica (CAC)

A concentração de associação crítica é um parâmetro importante para demonstrar a capacidade de auto-organização de copolímeros anfifílicos. Neste estudo, o comportamento de auto-organização dos copolímeros em meio aquoso foi investigado por fluorescência utilizando o pireno como sonda. O pireno tem baixa solubilidade em água e é muito sensível às mudanças de polaridade do ambiente. Quando as nanopartículas são formadas em meio aquoso, o pireno transfere-se significativamente para os domínios hidrofóbicos, resultando em uma alteração nas suas propriedades fluorescentes. A variação da razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) no espectro de excitação do pireno indica uma mudança na polaridade no seu ambiente (PATRIZI *et al.*, 2009).

Foi realizada a análise para os copolímeros nas razões molares de DS/PNIPAM 1:1 e 1:3, porém na razão 1:1 não ocorreu uma mudança significativa de comportamento nas concentrações analisadas. A Figura 15 mostra a razão de intensidades de excitação (I_{338}/I_{334}) em função da concentração logarítmica dos copolímeros em água à temperatura de 25 e 50 °C. Pode-se observar que a razão da intensidade de fluorescência de I_{338} por I_{334} manteve-se constante a baixas concentrações de copolímero nas duas temperaturas. Na temperatura de 50 °C as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e o PNIPAM tornam-se desfavoráveis, devido à predominância da interação hidrofóbica, ocorrendo assim a desidratação do mesmo. O copolímero forma agregados, ocasionando um aumento linear da razão I_{338}/I_{334} à medida que a concentração dos copolímeros atinge um valor limite. A concentração limite é a concentração de associação crítica do copolímero anfifílico, ou seja, é a concentração mínima para a formação das nanopartículas. Na temperatura de 25 °C não foi possível verificar um aumento linear significativo nas concentrações analisadas. Nesta temperatura ocorre somente uma tendência de formar agregados inter-cadeias nas concentrações próximas a 1 mg/mL devido ao aumento da concentração.

Os valores da CAC foram determinados pela interseção entre as retas como mostrado na Figura 15. Pode-se observar que quanto maior a quantidade de PNIPAM enxertada, mais hidrofóbico torna-se o copolímero. O copolímero com razão molar 1:1 não apresentou CAC nas concentrações estudadas, devido ao número reduzido de domínios hidrofóbicos, que dificultam o processo de formação dos agregados. A CAC para o copolímero 1:3 foi 0,176 mg/mL, muito inferior à concentração utilizada para determinar o tamanho de partícula e o potencial zeta. Valores maiores foram encontrados para goma guar carboximetilada enxertada com NIPAM a 25% (CAC: 1,038 mg/mL) (GUPTA; GHUTE; BADIGER, 2011).

Figura 15 - Relação entre a razão de intensidade (I_{338}/I_{334}) do espectro de excitação do pireno *versus* a concentração dos copolímeros em água: em (A) DS-g-PNIPAM e (B) DS-g-3PNIPAM.



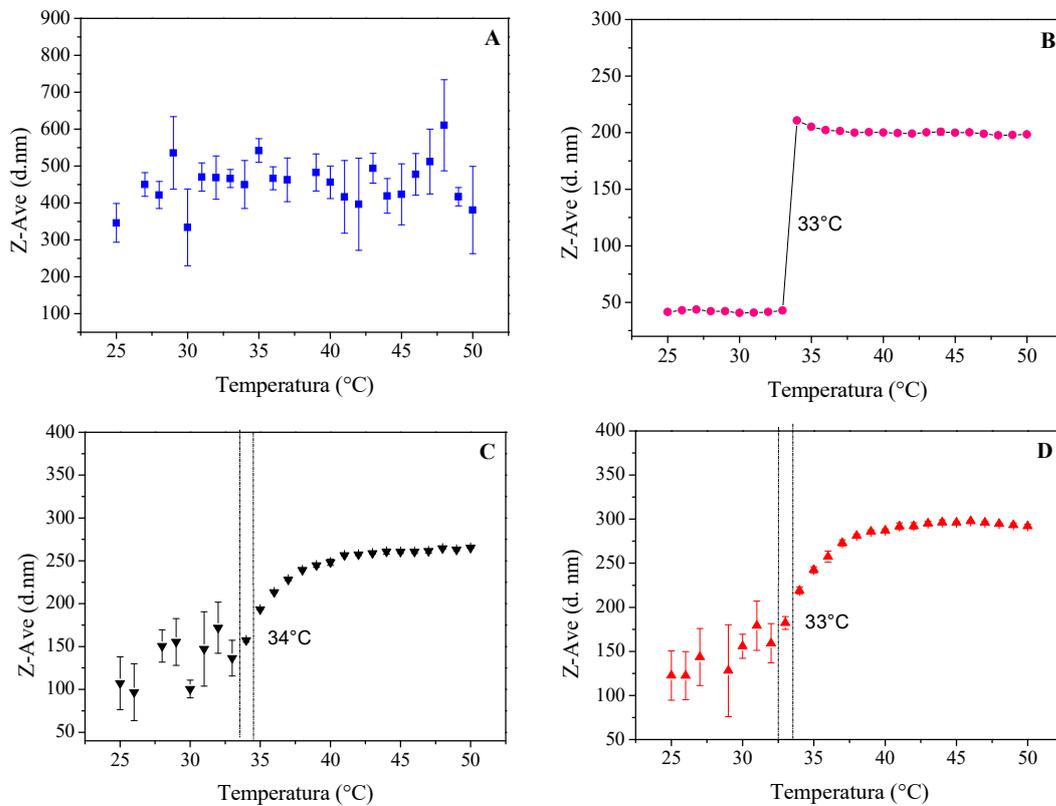
Fonte: Dados da pesquisa

4.8.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro e a temperatura de transição dos copolímeros foram determinados por *Espalhamento de Luz Dinâmico* (DLS), também conhecida como Espectroscopia de Correlação Fotônica (PCS)

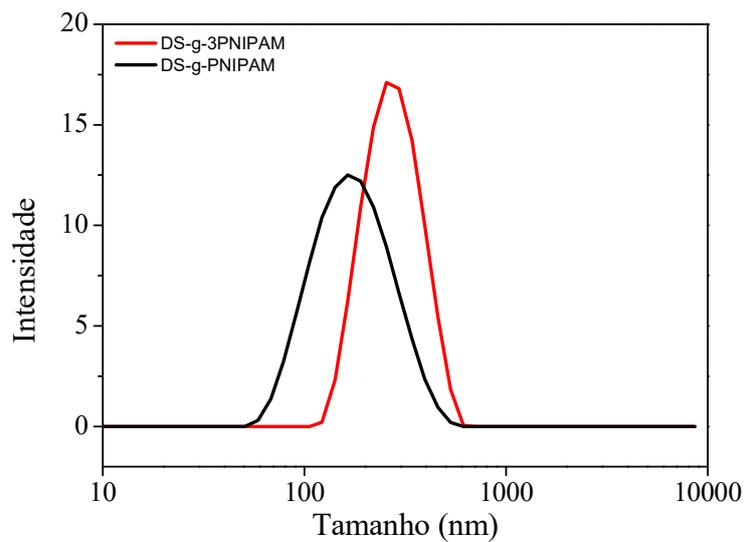
A Figura 16 apresenta a variação do tamanho (em água) com o aumento da temperatura do homopolímero e dos copolímeros formados a partir das relações molares PNIPAM/DS. O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas foi obtido por espalhamento dinâmico de luz e todos os sistemas apresentaram distribuição de tamanho unimodais na LCST, como pode ser verificado na Figura 17.

Figura 16 - Relação do tamanho de partícula com a temperatura de A – Sulfato de dextrana, B – PNIPAM, C – DS-g-PNIPAM e D – DS-g-3PNIPAM



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 17 - Distribuição de tamanho das nanopartículas na temperatura de transição



Fonte: Dados da pesquisa

Os valores de diâmetro, índice de polidispersidade (IPD) e potencial zeta

para as nanopartículas são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Propriedades das nanopartículas auto-organizadas (37 °C)

Nanopartículas	Diâmetro (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
DS	463,0 ± 59,2	0,66 ± 0,11	-38,8 ± 5,4
PNIPAM	201,0 ± 0,5	0,16 ± 0,01	-
DS-g-PNIPAM	228,2 ± 9,0	0,37 ± 0,06	-42,1 ± 4,3
DS-g-3PNIPAM	273,0 ± 3,5	0,16 ± 0,01	-44,7 ± 2,5

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 9 - Propriedades das nanopartículas auto-organizadas (50 °C)

Nanopartículas	Diâmetro (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
DS	381,1 ± 118	0,34 ± 0,045	-39,8 ± 4,4
PNIPAM	200,0 ± 0,1	0,06 ± 0,003	-
DS-g-PNIPAM	265,2 ± 1,4	0,04 ± 0,007	-43,0 ± 4,1
DS-g-3PNIPAM	292,0 ± 2,1	0,13 ± 0,022	-44,0 ± 2,2

Fonte: Dados da pesquisa

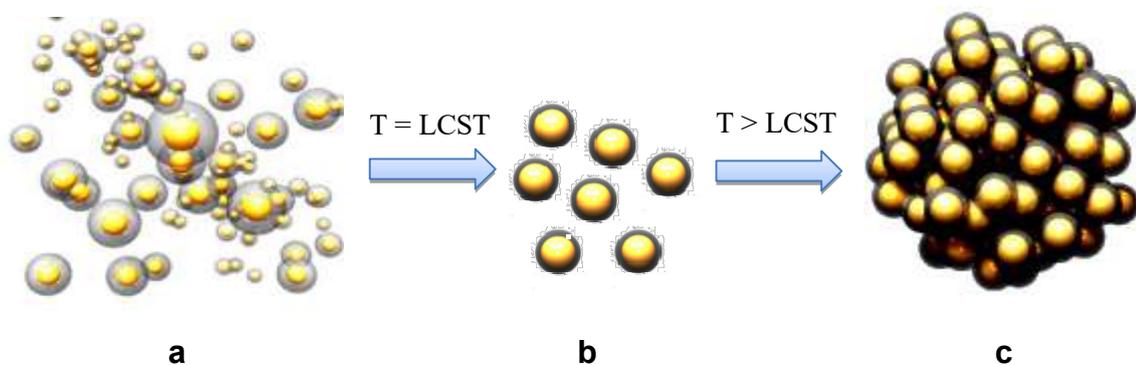
Em temperaturas abaixo da LCST, a porção hidrofílica dos segmentos facilita uma forte interação entre o copolímero e as moléculas de água através das ligações de hidrogênio. À medida que se eleva a temperatura, as ligações de hidrogênio existentes são enfraquecidas, contribuindo para o processo de desidratação. Sendo assim, ocorrerá uma aproximação inter-cadeias resultando na agregação do copolímero, devido à predominância de ligações intermoleculares entre os grupamentos do PNIPAM (UMAPATHI *et al.*, 2018). Macroscopicamente, isso pode ser observado pelo efeito de turvação da solução.

O DS não apresentou temperatura de transição. Os valores de LCST para o homopolímero e os copolímeros foram semelhantes (33 – 34 °C), apesar de apresentarem teores de NIPAM diferentes. Foi possível observar pelos dados de DLS que todos os copolímeros sintetizados formaram nanopartículas quando

aquecidos. O índice de polidispersidade da nanopartícula obtida do copolímero DS-g-3PNIPAM foi 0,16 à temperatura de 37 °C, indicando boa homogeneidade. A temperatura de 37 °C, o copolímero DS-g-PNIPAM apresentou um valor de IPD superior, sendo o mais heterogêneo dos sistemas apresentados. Esse fenômeno pode ser explicado pelo baixo teor de PNIPAM na estrutura, dificultando a organização das nanoestruturas. Ou seja, maiores teores de PNIPAM ocasionam uma maior estabilidade das nanopartículas formadas. Com relação ao potencial zeta, já era previsto que as nanopartículas de DS enxertadas com PNIPAM apresentassem cargas negativas, devido à presença dos grupos sulfato.

Foi observado que um aumento da razão molar PNIPAM/DS ocasionou aumento do tamanho de partícula. Esse aumento acentuado no tamanho indica que possivelmente pequenas nanoestruturas se associaram e formaram agregados maiores a essa temperatura (ABREU *et al.*, 2016), ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Agregação promovida pelo aumento da temperatura, onde: **a** – representa a interação dos copolímeros com moléculas de água, **b** – mostra que a elevação da temperatura ocasiona a desidratação e por consequência um aumento de interações da cadeia lateral e **c** – ilustra a formação de agregados



Fonte: O autor

Com a análise, foi observado que é possível a formação das nanopartículas através da elevação da temperatura, provando o caráter termorresponsivo dos copolímeros. Comprovou-se, também, que a elevação do teor de NIPAM facilita a formação de nanoestruturas mais homogêneas. Um aumento do teor de PNIPAM também corrobora com a elevação da hidrofobicidade do material após a LCST, apresentando boas propriedades para o encapsulamento do metotrexato.

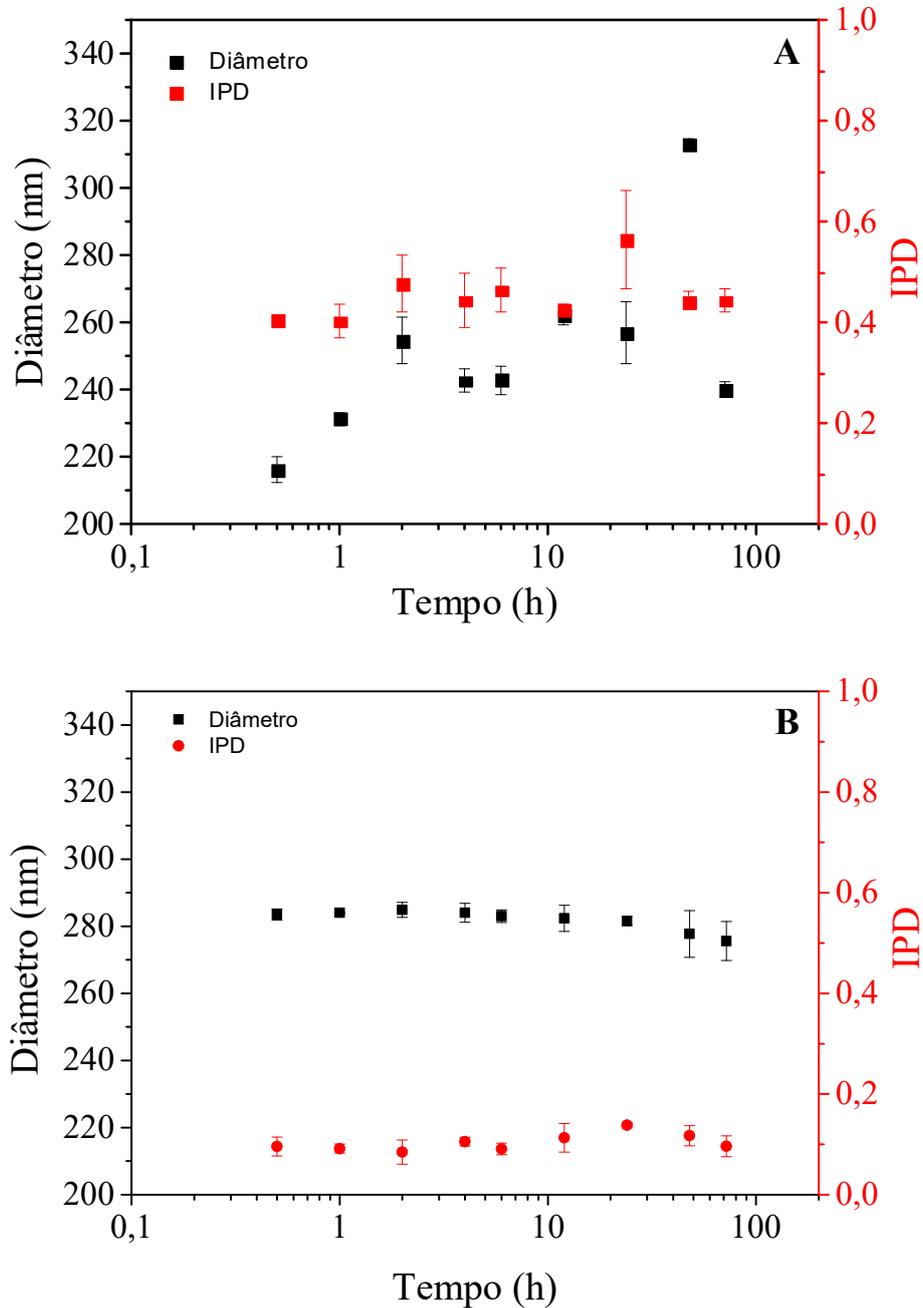
4.8.3 Estabilidade em tampão fosfato (pH 7,4)

A estabilidade físico-química de nanopartículas de copolímeros anfifílicos é de extrema importância para suas aplicações biológicas, pois afeta diretamente a absorção e a distribuição fisiológica do fármaco (FENG *et al.*, 2018).

Sendo assim, foi realizado um estudo de estabilidade das nanopartículas em tampão fosfato, pH 7,4 a 37 °C. O diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanopartículas foram os parâmetros avaliados durante um período de 72 h, período estimado de circulação de um fármaco em meio fisiológico.

Na Figura 19, tem-se a variação do diâmetro médio das nanopartículas dos copolímeros DS-g-PNIPAM e DS-g-3PNIPAM. Com o tempo de estocagem, DS-g-PNIPAM apresenta uma variação significativa do diâmetro médio das nanopartículas durante as 72 h e seus valores de IPD sofrem alterações significativas. Essa variação pode estar relacionada à baixa enxertia observada nessa razão molar, que contribui para a formação de nanoestruturas mais heterogêneas e menos compactas, tornando as interações entre o PNIPAM e a água mais pronunciada. Já o copolímero DS-g-3PNIPAM apresentou grande estabilidade e baixa variação de tamanho durante o período analisado, ou seja, alta estabilidade, que se deve a maior enxertia de PNIPAM.

Figura 19 - Estabilidade dos copolímeros, onde (A) DS-g-PNIPAM e (B) DS-g-3PNIPAM, ambos em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.



Fonte: Dados da pesquisa

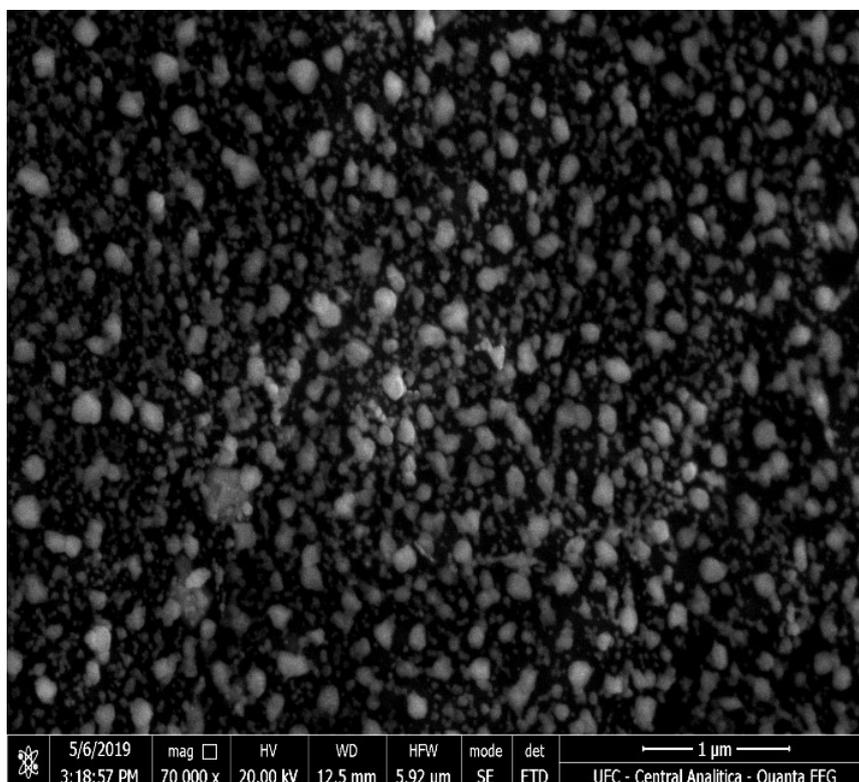
4.8.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície da NP influencia significativamente o carregamento de fármacos, eficiência de encapsulamento, características de liberação do fármaco, farmacocinética, biodistribuição e também desempenha um

papel importante na captação celular, ligação ao receptor e interação com células (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2012; TRUONG *et al.*, 2015).

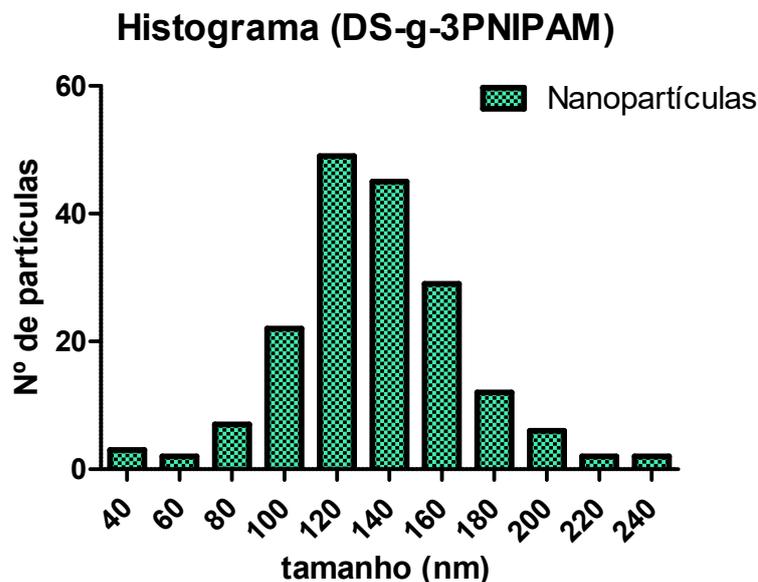
Na Figura 20 é possível observar que as nanopartículas formadas apresentam aspecto esférico. O diâmetro das nanopartículas observados por DLS geralmente são maiores que os obtidos por microscopia, visto que a forma de preparo leva a alterações das propriedades do material. Através da realização de um histograma com valores de tamanhos de 179 nanopartículas observadas através do MEV, foi observado que as nanopartículas à temperatura de 37 °C apresentam um diâmetro médio de $132,5 \pm 32,6$ nm, tamanho muito inferior ao obtido por DLS, de $273,0 \pm 3,5$ nm (.Figura 21). Uma explicação para esse fato é que no MEV as nanopartículas estão na ausência de água facilitando uma maior interação com seu núcleo hidrofóbico, ocasionando essa redução de tamanho. Já por DLS, a análise é realizada em solução, e isso favorece um aumento de interações entre superfícies, moléculas e íons levando a criação de camadas adsorvidas, ocasionando um aumento de tamanho (DALSTEIN *et al.*, 2015).

Figura 20 - Micrografia para a nanopartícula DS-g-3PNIPAM na concentração de 0,1 mg/mL



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 21 – Histograma de tamanhos relativos das nanopartículas do DS-3-PNIPAM



Fonte: Dados da pesquisa

4.9 Incorporação do Metotrexato

4.9.1 Determinação da Eficiência de encapsulamento e Conteúdo de fármaco do MTX

A eficiência de encapsulamento (EE) é um fator crítico que precisa ser otimizado durante o projeto de formulação do copolímero, pois tem um impacto sobre a liberação do fármaco (KHOSA *et al.*, 2018). Para esse procedimento, o copolímero DS-g-3PNIPAM foi escolhido por apresentar maior enxertia de PNIPAM, maior uniformidade de tamanho, maior estabilidade temporal e maior caráter hidrofóbico após a LCST. A eficiência de encapsulamento (%EE) foi analisada utilizando o comprimento de onda 302 nm, que é característico do MTX. A %EE obtida foi de $27,6 \pm 3,6$ e como conteúdo de fármaco (%CF) foi determinado um valor de $5,7 \pm 0,6$. Na Tabela 10, estão representados os valores de %EE e %CF em trabalhos que realizam o encapsulamento de fármacos através de copolímeros que apresentam PNIPAM em sua estrutura.

Tabela 10 – Dados da literatura sobre o encapsulamento promovido por copolímeros de PNIPAM

Materiais de Partida	Valores da Literatura		Referência
	%EE	%CF	
Poli (N-isopropilacrilamida-co-poli (L-lisina))	12,66 - 20,1	0,84 – 1,28	Tu; Wang e Chen, 2011
Nanopartículas magnéticas de poli (N-isopropilacrilamida)-co-poli (ácido acrílico)	31,5	6,5	Amantea, <i>et al.</i> , 2019
Dextrana e poli (N-isopropilacrilamida)	48,7	9,7	Blanco-Fernandez <i>et al.</i> , 2017

Fonte: O autor

Os valores observados nos trabalhos de Blanco-Fernandez *et al.*, (2017) são superiores aos observados nesse trabalho. Uma possível explicação seria que a utilização da dextrana com grupamentos sulfato ocasiona um maior impedimento estérico, dificultando o processo de copolimerização, onde as cadeias laterais adicionadas encontram-se mais distantes uma da outra, levando a uma diminuição das forças intermoleculares e menor eficiência de encapsulamento. Porém, em comparação aos trabalhos Tu, Wang e Chen (2011) e Amantea *et al.* (2019) os resultados são satisfatórios. Um grande diferencial observado é a ausência de ligantes específicos. Os copolímeros mencionados não apresentam ligantes direcionadores para regiões inflamadas, o que diminui a seletividade da nanopartícula. Este fator é superado com a presença de ligantes sulfato, como já mencionado nesse trabalho, o que viabiliza a utilização do copolímero DS-g-3PNIPAM como nanocarreador de MTX.

5 CONCLUSÃO

A síntese dos copolímeros foi confirmada pelas técnicas de FTIR e RMN H^1 , mostrando a eficiência da reação de enxertia tipo *graft from* via radicais livres. O grau de inserção das cadeias de PNIPAM ocasionou modificações térmicas nos copolímeros e apresentou uma maior organização estrutural à proporção que foi aumentada a razão molar PNIPAM/DS. À medida que a enxertia do PNIPAM era aumentada foi observada uma redução da massa molar que também pode ser explicada pela degradação da cadeia de DS e pela maior organização promovida pela presença desses grupamentos na cadeia polimérica.

O grau de enxertia de PNIPAM no DS foi maior quanto maior a proporção de PNIPAM adicionados no meio reacional. Os copolímeros obtidos mostram um aumento de tamanho de partícula conforme a razão molar PNIPAM/DS for aumentada, podendo estar relacionado à agregação das nanopartículas ou à formação de cadeias mais prolongadas de PNIPAM. Os copolímeros apresentaram raios hidrodinâmicos menores que 300 nm, o que viabiliza a sua utilização na liberação de fármacos. O copolímero DS-g-3PNIPAM se mostrou como o mais indicado para a incorporação do metotrexato, apresentando uma eficiência de encapsulamento de 27,6% e como conteúdo de fármaco de 5,7%.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. M.W.S.; PAULA, H. C. B.; SEABRA, V.; FEITOSA, J. P. A.; SARMENTO, B.; DE PAULA, R. C. M. 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. 77-85, 2016.
- AMANTEA, B. E.; PIAZZA, R. D.; CHACON, J. R.; SANTOS, C. C.; COSTA, T. P.; ROCHA, C. O.; BRANDT, J.; GODOI, D. R. M.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C. Esterification influence in thermosensitive behavior of copolymers PNIPAm-co-PAA and PNVCL-co-PAA in magnetic nanoparticles surface. **Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 575, p. 18 – 26, 2019.
- BLANCO-FERNANDES, B.; CONCEIRO, A.; MAKWANA, H.; FERNANDEZ-TRILLO, F. et al. Dually sensitive dextran-based micelles for methotrexate delivery. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, p. 14448-14460, 2017.
- BOGUSZ, K.; ZUCHORA, M.; SENCADAS, V.; TEHEI, M.; LERCH, M. Synthesis of methotrexate-loaded tantalum pentoxide – poly (acrylic acid) nanoparticles for controlled drug release applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 538, p. 286–296, 2019.
- CÁMARA, C. I.; LURGO, F. E.; FANANI, M. L.; WILKE, N. Mechanical Stability of Lipid Membranes Decorated with Dextran Sulfate. **ACS Omega**, v. 3, p. 11673–11683, 2018.
- CHEN, S.; ZHONH, H.; GU, B.; WANG, Y.; LI, X.; CHENG Z., ZHANG, L.; YAO, C. Thermosensitive phase behavior and drug release of in situ N-isopropylacrylamide copolymer, **Materials Science & Engineering C**. v. 32, p. 2199 – 2204, 2012.
- CHENG, X.; LEE, R. J. Multifunctional folate receptor-targeting and pH- responsive nanocarriers loaded with methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6735–6746, 2017.
- CHUMACHENKO, V.; KUTSEVOL, N.; HARAHUTS, Y.; RAWISO, M.; MARININ, A.; BULAVIN, L. 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.
- DALSTEIN, L.; BEM HADDADA, M.; BARBILLON, G.; HUMBERT, C. et al. Revealing the Interplay between Adsorbed Molecular Layers and Gold Nanoparticles by Linear and Nonlinear Optical Properties. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, ed. 30, p. 17146-17155, 2015.
- DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B. Polysaccharide Based Copolymers as Supramolecular Systems in Biomedical Applications. **Current Drug Targets**, v. 16, p. 1591-1605, 2015.
- DENG, F.; GE, X.; ZHANG, Y.; LI, M. C.; CHO, U. R. Synthesis and characterization

of microcrystalline cellulose-graft-poly(methyl methacrylate) copolymers and their application as rubber reinforcements. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 1–10, 2015.

DHANKA, M.; SHETTY, C.; SRIVASTAVA, R. Injectable methotrexate loaded polycaprolactone microspheres: physicochemical characterization, biocompatibility, and hemocompatibility evaluation. **Materials Science & Engineering C**, v. 81, p. 542-550, 2017.

DOLATI, S.; SADREDDINI, S.; ROSTAMZADEH, D.; AHMADI, M.; NIARAGH, F.; YOUSEF, M. Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 30–41, 2016.

EL-HAMSHARY, H.; FOUDA, M. M. G.; MOYDEEN, M.; et al. Synthesis and antibacterial of carboxymethyl starch-grafted poly(vinyl imidazole) against some plant pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1466–1472, 2015.

FENG, H.; SUN, Y.; ZHANG, J.; DENG, L.; DONG, A. Influence of supramolecular layer-crosslinked structure on stability of dual pH-Responsive polymer nanoparticles for doxorubicin delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 81-92, 2018.

GANDHI, A.; PAUL, A.; SEN, S. O.; SEM, K. K. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.10, p.99 -107, 2015.

GRAHAM, S.; MARINA, P. F.; BLENCOWE, A. Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 143-159, 2019.

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, n. 1, p. 74–80, 2011.

HACKER, M. C.; KLOUDA, L.; MA, B. B., *et al.* Synthesis and characterization of injectable, thermally and chemically gelable, amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide)-based macromers. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1558-1570, 2008.

HADJICHRISTIDIS, N.; IATROU, H.; PITSIKALIS, M; MAYS, J. Macromolecular architectures by living and controlled/living polymerizations. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 1068-132, 2006.

HAMMOUDA, B; JIA, D; CHENG, H. Single-Chain Conformation for Interacting Poly(N-isopropylacrylamide) in Aqueous Solution. **The Open Access Journal of Science and Technology**. v. 3, p. 1 – 8, 2015.

HESKINS, M; GUILLET, J. E. Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). **Journal of Macromolecular Science—Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 1441-1455, 1968.

HEO, R.; YOU, D. G.; UM, W.; CHOI, K. Y.; JEON, S.; PARK, J.S.; CHOI, Y.; KWON, S.; KIM, K.; KWON, I. C.; JO, D. G.; KANG, Y. M.; PARK, J. H. Biomaterials Dextran sulfate nanoparticles as a theranostic nanomedicine for rheumatoid arthritis. **Biomaterials**, v. 131, p. 15–26, 2017.

HUFENDIEK, A.; TROUILLET, V.; MEIER, M.A.R; BARNER-KOWOLLIK, C. Temperature Responsive Cellulose-graft-Copolymers via Cellulose Functionalization in an Ionic Liquid and RAFT Polymerization, **Biomacromolecules**, v. 15, n° 7, p. 2563-2572, 2014.

JANAKIRAMAN, K.; KRISHNASWAMI, V.; RAJENDRAN, V.; NATESAN, S.; KANDASAMY, R. Novel nano therapeutic materials for the effective treatment of rheumatoid arthritis-recent insights. **Materials Today Communications**, v. 17, p. 200–213, 2018.

JEON, S.; KO, H.; RAO, R.; YOON, H. et al., A versatile gold cross-linked nanoparticle based on triblock copolymer as the carrier of doxorubicin. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 70352 – 70360, 2015.

KALIA, S.; SABAA, M. W. **Polysaccharide Based Graft Copolymers**. 1. Ed., Berlin:Springer Science & Business Media, 2013.

KEKEZ, B.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; JAKOVLJEVIĆ, D.; et al. Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 20–29, 2016.

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

KIM, S. H.; KIM, J. H.; YOU, D. G.; SARAVANAKUMAR, G.; YOON, H. Y.; CHOI, K. Y.; THAMBI, T.; DEEPAGAN, V. G.; JO, D. G.; PARK, J. H. Self-assembled dextran sulphate nanoparticles for targeting rheumatoid arthritis. **Chemical Communications**, v. 49, n° 88, p. 10335–10434, 2013.

KOURILOVITCH, M.; MALDONADO, C. G.; PRADO, E. O. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 48-49, p. 26 - 30, 2014.

KUTSEVOL, N.;GLAMAZDA, A.; CHUMACHENKO, V.; HARAHTS, Y., *et al.*, Behavior of hybrid thermosensitive nanosystem dextran-graft-PNIPAM/gold nanoparticles: characterization within LCST. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 20, n° 236, 2018.

LAMICHHANE, S.; ANDERSON, J.; REMUND, T.; KELLY, P.; MANI, G. Dextran sulfate as a drug delivery platform for drug-coated balloons: Preparation, characterization, in vitro drug elution, and smooth muscle cell response. **Journal of Biomedical**, v.00B, p. 1-15, 2015.

LIU, F.; URBAN, M. W. Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers. **Progress Polymer Science**, v. 35, p. 3-23, 2010.

LIU, S.; SUN, G. Radical graft functional modification of cellulose with allyl monomers: Chemistry and structure characterization. **Carbohydrate Polymers**, v.71, p. 614–625, 2008.

LUO, Y.; YU, W.; XU, F.; ZHANG, L. Novel Thermo-Responsive Self-Assembly Micelles from a Double Brush-Shaped PNIPAM- g - (PA-b-PEG-b-PA)-g -PNIPAM Block Copolymer with PNIPAM Polymers as Side Chains. **Polymer Chemistry**, v.50, p. 2053–2067, 2012.

MAHANTA, A. K.; MITTAL, V.; SINGH, N.; DASH, D.; MALIK, S.; KUMAR, M.; MAITI, P. Polyurethane-grafted chitosan as new biomaterials for controlled drug delivery. **Macromolecules**, v. 48, p. 2654–2666, 2015.

MAHDAVINIA, G. R.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; POURJAVADI, A. Modified chitosan. III. Superabsorbency, salt- and pH-sensitivity of smart ampholytic hydrogels from chitosan-polyacrylonitrile. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 15, p. 173–180, 2004.

MAHNER, C.; LECHNER, M.; NORDMEIER, E. Synthesis and characterisation of dextran and pullulan sulphate. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 203-208, 2001.

MARQUES, N.; LIMA, B.; SILVEIRA, V.; LIMA, B. *et al.* PNIPAM-based graft copolymers prepared using potassium persulfate as free-radical initiator: synthesis reproducibility. **Colloid and Polymer Science**, v. 294, p. 981–991, 2016.

MAYA, S., SARMENTO, B., NAIR, A., REJINOLD, N. S., NAIR, S., V, ET AL. Smart stimuli sensitive nanogels in cancer drug delivery and imaging: A review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n° 41, p. 7203–7218, 2013.

MITRAGOTRI, S.; YOO, J. W., Designing Micro- and Nano-particles for Treating Rheumatoid Arthritis. **Archives of Pharmacol Research**, v.34, n° 11, 1887-1897, 2011.

MOAD, G.; SOLOMON, D. H. **The chemistry of radical polymerization**. 2 ed. Elsevier, 2006.

MOGHIMI, S; HUNTER, A.; ANDRESEN, T. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 52, p. 481–503, 2012.

MOVAHEDI, M.; BEAUCHAMP, M.; ABRAHAMOWICZ, M.; RAY, D. W.; MICHAUD, K.; PEDRO, S.; DIXON, W. G. Risk of incident diabetes mellitus associated with the dosage and duration of oral glucocorticoid therapy in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 68; n° 5, p. 1089–1098, 2016.

ODIAN, George. **Principles of polymerization**. 4. ed., New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2004.

PARIDA, U. K.; BINDHANI, B. K.; BISWAL, S. K.; NAYAK, P. Advances in Cellulose-

Based Graft Copolymers Prepared via Controlled Radical Polymerization Methods A Comprehensive Review. In: V. K. Thakur; **Cellulose-Based Graft Copolymers Structure and Chemistry**. CRC Press, p.89–122, 2015.

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, n. 10, p. 2779–2787, 2009.

PHAM, C.T. Nanotherapeutic approaches for the treatment of rheumatoid arthritis. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 607- 619, 2011.

ROSCA, C.; NOVAC, O; LISA, G; POPA, M.L. Polyelectrolyte complexes of chitosan with dextran sulphate. Synthesis and characterization, **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, n° 3-4, p. 185-189, 2011.

SANMARTÍ, R.; RUIZ-ESQUIDE, V.; HERNÁNDEZ, M. V. Rheumatoid Arthritis : A Clinical Overview of New Diagnostic and Treatment Approaches. **Current Topics in Medicinal Chemistry** , v. 13, p. 698–704, 2013.

SCHILD, H. G. Poly (N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. **Progress in Polymer Science**, p. 163–249, 1992.

SCHETT, G.; EMERY, P.; TANAKA, Y.; BURMESTER, G.; PISETSKY, D. S.; NAREDO, E.; FAUTREL, B.; VAN VOLLENHOVEN, R. Tapering biologic and conventional DMARD therapy in rheumatoid arthritis: current evidence and future directions, **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, p. 1428–1437, 2016.

SHI, H. Y.; ZHANG, L. M. New grafted polysaccharides based on O-carboxymethyl-O-hydroxypropyl guar gum and N-isopropylacrylamide: Synthesis and phase transition behavior in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 337–342, 2007.

SHIMIZU, K; FUJITA, H.; NAGAMORI, E. Oxygen plasma-treated thermoresponsive polymer surfaces for cell sheet engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v.106, p. 303-310, 2010.

SLIWA, T.; JARZEBSKI, M.; GAPINSKI, J.; GRZESZKOWIAK, M.; KLESHCHANOK, D. Stimuli-Responsible PNIPAM Based Copolymers: Modeling and Light Scattering Investigations. **Acta Physica Polonica A**, v. 125, n° 1236, p. 2014.

SUN, S.; HU, J.; TANG, H.; WU, P. Spectral interpretation of thermally irreversible recovery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogel. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 5061–5067, 2011.

TAYLOR, P.; MOORE, A.; VASILESCU, R., ALVIR, J., TARALLO, M. A structured literature review of the burden of illness and unmet needs in patients with rheumatoid arthritis: a current perspective, **Rheumatology International**, v. 36, n° 5, p. 685–695, 2016.

TOLEDANO, E.; YÉBENES, M. J. G.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, I.; CARMONA, L. Severity Indices in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. **Reumatología Clínica**, v. xx, p. 1-5, 2018.

TRUONG, N.; WHITTAKER, M.; MAK, C.; DAVIS, T. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, p. 129-142, 2015.

TU, Y. L.; WANG, C. C.; CHEN, C. Y. Synthesis and Characterization of pH-Sensitive and Thermosensitive Double Hydrophilic Graft Copolymers. **Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry**, v. 49, p. 2866-2877.

UMAPATHI, R.; REDDY, P. M.; RANI, A.; VENKATESU, P. Influence of additives on thermoresponsive polymers in aqueous media: A case study of poly(N-isopropylacrylamide). **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 9717 - 9744, 2018.

VALDEZ, O. G.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F. Graft Modification of Natural Polysaccharides via Reversible Deactivation Radical Polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 73, p. 151-173, 2018.

WANG, Z.; WU, P. The influence of ionic liquid on phase separation of poly(N-isopropylacrylamide) aqueous solution. **RSC Advances**, v. 2, p. 7099–7108, 2012.

WEI, H.; CHENG, S. X.; ZHANG, X. Z.; ZHUO, R. X. Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 9, p. 893–910, 2009.

WU, C.; ZHOU, S. Laser Light Scattering Study of the Phase Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) in Water. **Macromolecules**, v. 28, n°, p. 248381-8387, 1995.

YANG, L.; ZHANG, J.; HE, J.; ZHANG, J.; GAN, Z. Synthesis and Characterization of Temperature-sensitive Cellulose-graft-Poly(N-isopropylacrylamide) Copolymers. **Chinese Journal of Polymer Science**, v.33, p.1640-1649, 2015.

YU, M.; EVERY, H. A.; JISKOOT, W.; WITKAMP, G. J.; BUIJS, W. Molecular structure of dextran sulphate sodium in aqueous environment. **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 320-329, 2018.

YILMAZ, E.; YALINCA, Z.; YAHYA, K.; SIROTINA, U. pH responsive graft copolymers of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 90, p. 68–74, 2016.

ZHANG, J.; CUI, Z.; FIELD, R.; MOLONEY, M. G.; RIMMER, S.; YE, H. Thermo-responsive microcarriers based on poly(N-isopropylacrylamide). **European Polymer Journal**, v. 67, p. 346–364, 2015.

ZHANG, K.; BRENDLER, E.; GEISSLER, A.; FISCHER, S. Synthesis and

spectroscopic analysis of cellulose sulfates with regulable total degrees of substitution and sulfation patterns via ^{13}C NMR and FT Raman spectroscopy. **Polymer**, v. 52, p. 26 – 32, 2011.