

WAGNER MOREIRA PINHEIRO

**Elaboração de sistema sinérgico visando aplicações em nanobiotecnologia,
baseado em microesferas de polímeros naturais contendo berberina e
nanopartículas de ouro associada a doxorrubicina.**

BRASÍLIA

2015



INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANBIOTECNOLOGIA

WAGNER MOREIRA PINHEIRO

Elaboração de sistema sinérgico visando aplicações em nanobiotecnologia, baseado em microesferas de polímeros naturais contendo berberina e nanopartículas de ouro associada a doxorrubicina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes.

Co – orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Brasília

2015



Dissertação de Mestrado

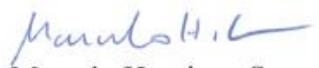
Wagner Moreira Pinheiro

Título:

“Elaboração de sistema sinérgico visando aplicações em nanobiotecnologia baseado em microesferas de polímeros naturais contendo berberina e nanopartículas de ouro associada a doxorubicina”

Comissão Examinadora:


Prof. Dra. Cláure Nain Lunardi Gomes
Presidente
UnB


Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
Membro Titular Interno vinculado ao Programa
UnB


Prof. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva
Membro Titular Externo não vinculado ao programa
UFPA

Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
Membro Suplente Interno não vinculado ao programa
UnB

Brasília, 28 de maio de 2015.

*À minha esposa e companheira
Kimiko e aos meus filhos Carlos Toyozô e
Caio Hiro, pela compreensão, apoio e
paciência durante essa caminhada. Não tenho
palavras para agradecer.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente!

À professora Dra. CLaure Nain Lunardi Gomes, pela confiança, ajuda, apoio durante todo esse processo, nos momentos que me orientou a buscar e ter mais certeza do trabalho. Pela acertivas sugestões e tão iluminadas ideias. Por me tornar uma pessoa melhor e mais humana, permitindo-me viver no meio científico sempre com dignidade e respeito.

Ao professor Anderson de Jesus Gomes, pela co-orientação tão ética.

A minha família que me trouxe inspiração e serenidade com palavras de amor e solidariedade.

Ao Henrique que me incentivou e ensinou com tranquilidade e atenção toda inicial síntese química da pesquisa.

Ao Diego, Diegão, que me trouxe e presenteou com inúmeras ajudas, grande companheiro de estudo e de força nas horas difíceis, valeu por todas as dicas conceituais e pelos treinamentos e ensaios experimentais repetidos no CEM 04 e na UAB.

A profa. Dra. Sônia Bão, por permitir a metalização das amostras no laboratório de microscopia eletrônica.

Ao professor e coordenador do PPGNANO, Dr. Sebastião William da Silva pela cordialidade e atenção.

Aos meus amigos e colegas do Colégio La Salle Brasília pelo apoio e compreensão em dias de estudos.

A minha amada esposa que me trouxe segurança e apoio verdadeiro e aos meus filhos por torcerem por mim.

Ao INCT em Nanobiotecnologia, à CAPES, DPP-UnB, CNPq, FAPDF e a FINATEC.

A todo corpo técnico da UnB (especialmente a Kelly, Kézia, Marquinhos, Cláudio, João Martins, Indrid e Márcia).

RESUMO

O estudo de novos fármacos e a otimização dos processos de biodistribuição, tem sido alvo de diversos estudos em nanobiotecnologia, com essa abordagem o presente trabalho tem como principal objetivo interligar o sistema microscópio, advindo de polímeros naturais e de berberina, que formaram microesferas, com nanopartículas de ouro obtidas a partir da metodologia modificada de Turchevich. No sistema de nanopartículas de ouro foi associado antibiótico citostático doxorrubicina, sendo esta associação realizada por duas metodologias: associação eletrostática junto as cargas de íons citrato na superfície da partícula de ouro; ou por acoplamento EDC/NHS do fármaco a superfície modificada das nanopartículas de ouro pelo THPAL. Os sistemas micro e nanoestruturados foram avaliados frente a características físico-químicas tais como: distribuição de tamanho, potencial zeta, análises térmicas, análises espectroscópicas de absorção na região Uv-vis, infravermelho com transformada de Fourier e análises de estrutura morfológica utilizando microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Os resultados obtidos com ambos os sistemas micro e nanoestruturado isoladamente e associados mostraram que os sistemas mistos obtidos são promissores para o carreamento de fármacos. As microesferas apresentaram diâmetro médio de 0,65 μ m quando secas e entumescidas de 0,85 μ m, com parâmetros físico-químicos medidos (0,25 \pm 0,05) fração de água retida, (30,15 \pm 10,6%) percentual de hidratação, (24,55 \pm 5,3%) inchaço e 1,25 \pm 0,05 difusão. As análises térmicas dos sistemas mistos contendo ou não AuNPs mostraram ter transição vítrea no geral até a temperatura de 80°C e que há uma diferença entre os sistemas que contem AuNP quanto a perda de massa (TGA).

Palavras-chaves: microesferas beads; alginato; quitosana; berberina; nanopartículas de ouro, doxorrubicina, THPAL e EDC/NHS.

ABSTRACT

The study of new drugs and the optimization of biodistribution processes, has been the subject of several studies in nanobiotechnology, with this approach the present work aims to link the microscope system, arising from natural polymers and berberine, which formed microspheres with gold nanoparticles obtained from Tucheich methodology. In the gold nanoparticles system has been associated antineoplastic antibiotic, doxorubicin citrate particles and particles coupled to THPAL and covalently linked to doxorubicin. Were preparation of the systems evaluated the physicochemical and morphological parameters, such as, size, zeta potential, simultaneous differential thermal and thermogravimetric, electronic absorption spectra in the UV-vis region, FTIR transform infrared Fourier electronic microscopy scanning and transmission.

The results obtained with both micro- and nanostructured systems and associated alone showed that the obtained mixed systems are promising for the carrying of drugs. The microspheres had an average size of 0.65 μ m and 0.85 μ m, with measured physical and chemical parameters (0.25 \pm 0.05) retained water fraction (30.15 \pm 10.6%) hydration percentage (24.55 \pm 5.3%) swelling and 1.25 \pm 0.05 diffusion. The thermal analysis of mixed systems with or without AuNPs shown to have glass transition in general until the temperature of 80°C and that there is a difference between the systems containing AuNP as the weight loss (TGA).

Key words: beads microspheres; alginate; chitosan; berberine; gold nanoparticles, citrate, doxorubicin, THPAL and EDC / NHS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fórmula estrutural simplificada de alginato de sódio.
- Figura 2:** Fórmula estrutural simplificada de amino quitosana.
- Figura 3:** Taça de Licurgo (KILLICK, 1996).
- Figura 4:** Equações de redução do HAuCl_4 ouro metálico.
- Figura 5:** Equação de redução do HAuCl_4 por íons citrato: nanopartículas de ouro.
- Figura 6:** Frequência de plasmon e dependência da corx tamanho das partículas (TOMA,2010).
- Figura 7:** Esquema ilustrativo das ligações a superfície da AuNP (iônica e covalente).Conde et al. (permissão de uso concedida)
- Figura 8:** Fórmula estrutural da berberina.
- Figura 9:** Fórmula estrutural simplificada de Cloridrato de Doxorrubicina.
- Figura 10:** Esquema de microesferas com nanopartículas de ouro associada a doxorrubicina em citrato e com acoplamento a THPAL.
- Figura 11:** a) Gotejamento do gel de Alginato b)Beads no agitador magnético após o gotejamento.
- Figura 12:** a) Beads secas b)Beads entumescidas na preparação 02.
- Figura 13:** Preparo das nanopartículas de ouro pelo método Turchevich.
- Figura 14:** Espectro de absorção normalizado do sistema 1 e 2 em água ultra pura.
- Figura 15:** Espectro de absorção normalizado dos sistemas 2,3 e 4 em água ultra pura.
- Figura 16:** Espectro de absorção normalizado do sistema 2,5 e 6 em água ultra pura.
- Figura 17:** Espectro de FTIR do fármaco BS na forma livre em pastilha de KBr.
- Figura 18:** Espectro de FTIR do fármaco DOX na forma livre em pastilha de KBr.
- Figura 19:** Espectros de FTIR dos sistemas 7 e 8 sobrepostos em pastilhas de KBr.
- Figura 20:** Espectros de FTIR dos sistemas 9 e 10 sobrepostos em pastilhas de KBr.
- Figura 21:** Tamanho de nanopartículas por DLS (Sistema 3).
- Figura 22:** Distribuição de tamanho de AuNPcit+DOX (sistema 4).
- Figura 23:** Distribuição de tamanho de AuNP EDC/NHS (Sistema 5).
- Figura 24:** Distribuição de tamanho de AuNP EDC/NHS+DOX (Sistema 6).
- Figura 25:** Microscopia eletrônica de transmissão de AuNPcit (sistema 3).

Figura 26: A) foto das microesferas de ALG recoberta com QS contendo BS; B) análise no ImageJ (particle analysis); C) resultado de distribuição de tamanho médio (pixel).

Figura 27: Microesferas beads do sistema 7 secas/vazias analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 154 a 540x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 154 a 540x).

Figura 28: Microesferas beads do sistema 7 secas/vazias analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 3216 a 16064x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 3216 a 16064x).

Figura 29: Microesferas beads do sistema 9 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 160 a 327,58x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 160 a 327,58x).

Figura 30: Microesferas beads do sistema 9 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 811,0 a 1635x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 811,0 a 1635x).

Figura 31: Microesferas beads do sistema 10 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 156,0 a 327x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 156,0 a 327,0x).

Figura 32: Microesferas beads do sistema 10 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 1637 a 3275x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 1637 a 3275x).

Figura 33: Curva de DSC normalizada (sistema de 7 a 10).

Figura 34: Gráfico normalizado da TGA sistemas 7-10.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema em ordem crescente e/ou soluções ou microesferas.

Tabela 2. Avaliação do tamanho de microesferas de quitosano com berberina ($1,2 \text{ mol. L}^{-1}$) em diferentes concentrações de agente reticulante.

Tabela 3. Preparação, soluções, diâmetro médio e quantidade de microesferas produzidas.

Tabela 4. Diâmetro médio das microesferas da preparação 02, secas e entumescidas.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos das amostras microesferas beads na preparação 2 (fração da água retida (Wf), percentual de hidratação (%Ds), inchaço (%Dsw) e Difusão (Dm).

Tabela 6. Bandas de absorção no FTIR, doxorubicina, berberina, citrato de sódio, alginato de sódio e quitosana.

Tabela 7. Sistema 3-6 medidas de diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta dos Sistema 3 – 6.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs: Absorbância de substância no comprimento de onda de excitação

ALG: Alginato

AuNP: Nanopartículas de ouro

AuNPcit: Nanopartículas de ouro com citrato

AuNPedc/nhc: Nanopartículas de ouro N-hidroxisuccinimida/1-etil-3-[3-dimetilaminopropil carbodiimida

BS: Berberina

BEADS: esferas

DOX: Doxorrubicina

DDS: Drug delivery system

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSC: Differential scanning calorimetry (calorimetria diferencial de varredura)

ETD: Everhart-Thornley Detector

EBS: Electron BackScatter Diffraction

Et al: e outros

FTIR: Fourier Transform Infrared

HAc: ácido acético

HAuCl₄: ácido tetracloroaurico

IB/UnB: Instituto de Biologia/Universidade de Brasília

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

NPs: Nanopartículas

pH: potencial hidrogeniônico

RNA: ácido ribonucleico

QS: Quitosana

Tg: Temperatura de transição vítrea

TGA: Thermogravimetric Analysis

THPAL: Tris (hidroximetil)fosfina)+D/L-alanina

UV-vis: Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1.0 Introdução

1.1	Nanotecnologia.....	18
1.2	Microencapsulação em sistemas nanoestruturados.....	20
1.3	Alginato de Sódio.....	23
1.4	Quitosana.....	24
1.5	Nanopartículas de Ouro (AuNP).....	28
1.6	Fármacos.....	34
1.6.1	Berberina.....	34
1.6.2	Doxorrubicina.....	36

2.0 Objetivos

2.1	Objetivo Geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38

3.0 Materiais e Métodos

3.1	Equipamentos.....	40
3.2	Reagentes.....	42
3.3	Soluções.....	43
3.3.1	Preparo das soluções estoques para o preparo dos sistemas 1 e 2.....	45
3.3.2	Preparo das nanopartículas de ouro (AuNPcit) dos sistemas 3 e 4.....	45
3.3.3	Produção das Nanopartículas de ouro.....	46
3.3.4	Preparo da nanopartícula de ouro modificada dos sistemas 5 e 6.....	47
3.4	Preparo das Microesfera bead do sistema 7 e 8.....	47
3.4.1	Preparo das Microesfera bead do sistema 9 e 10.....	47
3.4.2	Redução da concentração de CaCl_2	48
3.5	Caracterização dos sistemas.....	50
3.5.1	Medidas de Espectroscopia.....	51

3.5.1.2 Espectroscopia FTIR.....	51
3.5.1.3 Espectroscopia de Absorção Molecular – Uv-vis.....	51
3.6 Análises Térmicas.....	52
3.6.1 Termogravimétrica/Diferencial Simultânea (TGA/DTA).....	52
3.6.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	52
3.7 Tamanho, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão.....	53
3.8 Análise Morfológica dos sistemas.....	53
3.8.1 Análise de Microscopia de Varredura.....	55
3.9 Caracterização físico-químicas das microesferas (bead) poliméricas produzidas.....	56
3.9.1 Fração de água retida (Water fraction).....	56
3.9.1.2 Difusão, Percentual de Hidratação e Inchaço.....	57
3.9.1.3 Análise do diâmetro médio e polidispersão por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) AuNPcit (sistema 3).....	57
3.10 Análise estatística e gráfica.....	57
4.0 Resultados e Discussões	
4.1 Produção das Microesfera polimérica.....	59
4.1.2 Sistema Misto: Microesfera de quitosana/alginato contendo Berberina e nanopartículas de ouro associadas a Doxorrubicina.....	64
4.2 Caracterização dos sistemas 1-10.....	65
4.2.1 Análise espectroscópica Uv-vis e FTIR.....	65
4.3 Análise de tamanho.....	72
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	75
4.5 Sistema 7 e 8 tamanhos das microesferas de alginato e quitosana.....	76
4.6 Sistema 3-6 através do potencial zeta.....	76
4.7 Sistema 7-10 através das fotos mev.....	78
4.8 Análise Calorimétrica e Termogravimétrica.....	88
5.0 Conclusões.....	93
6.0 Referências Bibliográficas.....	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia como atividade científica atua no desenvolvimento de materiais e substâncias com precisão de átomo a átomo (QUINA, 2004). “Nanotecnologia é o estudo, design, criação, síntese, manipulação e aplicação de materiais funcionais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria em nível nanométrico (1-100 nanômetros), isto é, em nível atômico e molecular, e a exploração de novos fenômenos e propriedades da matéria nesta escala” (AZEVEDO, 2005). Hoje, estão amplamente difundidos no mercado diversos produtos nanotecnológicos, tais como: sistemas inteligentes com nanochips, tintas com nanopartículas metálicas, filtros solares, ligas metálicas e embalagens biodegradáveis. Laboratórios farmacêuticos têm realizado extensas pesquisas para a obtenção de micro e nanopartículas, a fim de gerar melhoramentos nas características e propriedades físico-químicas de seus produtos (SCENIHR, 2005; TOMELLINI, 2006).

Os materiais nanoestruturados têm sido cada vez mais relevantes em diferentes áreas de ciência e tecnologia, onde construir e controlar propriedades desses materiais são de interesse em nível atômico e molecular para o desenvolvimento de novas aplicações (NALWA, 2002). As bases da nanociência e nanotecnologia foram inicialmente divulgadas pelo físico americano Richard Feynman em 1959 em uma palestra com o título “*There is Plenty of Room at the Bottom*”. Nesta conferência, Richard Feynman introduziu a discussão temática com possibilidades de miniaturização da matéria e possibilidades de obter materiais, com manipulação atômica.

A nanociência e a nanotecnologia se utilizam de conceitos para obtenção de sistemas nanoestruturados: *top-down* (de cima para baixo) e *bottom-up* (baixo para cima) (PAULINO SILVA, 2014). No processo *top-down* ocorre pela miniaturização do material e da estrutura em escala microscópica para a escala nanoscópica. Na obtenção *bottom-up* a construção das

estruturas de nanomateriais ocorre a partir de átomos e moléculas na forma unitária, com um controle tridimensional a fim de obter sistema complexos, nessa abordagem se utilizam espécies químicas orgânicas e inorgânicas para que sirvam de blocos de construção das nanoestruturas.

Neste sentido, nanopartículas ganharam destaque como blocos de construção sintéticos ideais em estruturas tipo *bottom-up*, utilizando-se de diversas estratégias moleculares para se obter a referida nanoestrutura, em particular algumas vantagens dessa abordagem devem proporcionar as nanopartículas e nanomateriais: tamanho uniforme, forma definida, possibilidade de acoplamento de ligantes (NALWA,2002).

Devido ao fato das nanopartículas serem muito pequenas e termodinamicamente instáveis, torna-se necessário estabilizá-las mediante a adição de reagentes protetores. A estabilização eletrostática ocorre através de espécies carregadas, como cátions e ânions, que se adsorvem à superfície das nanopartículas, uma outra forma ocorre através do uso de grupos volumosos. Além disso, a escolha adequada do material de proteção também pode fornecer uma barreira para neutralizar a atração entre as nanopartículas, devido à interação das forças de van der Waals (FONSECA, 2005), evitando que as mesmas se aglomerem.

Potenciais aplicações na concepção e desenvolvimento de dispositivos em nanoescala, como nano-sensores para aplicações biomédicas, demonstram a importância de se caracterizar a superfície de nanopartículas, com a finalidade de se estabelecer um padrão para construção de nanomateriais com drogas e ativos de interesse a saúde, em nanobiotecnologia.

A interação da biotecnologia e da nanotecnologia tem levado ao desenvolvimento de nanomateriais que misturam sistemas biológicos de reconhecimento como: proteínas enzimáticas em nanopartículas, a depender das propriedades eletrônicas e óticas esses sistemas, podem ser otimizados pelo processo de funcionalização de nanopartículas processo

pelo qual se altera a superfície a fim de se promover melhorias nas propriedades físico-químicas das nanopartículas, a depender da aplicabilidade (NGHIEM et al, 2010).

1.2- Microencapsulação em sistemas nanoestruturados.

Nos últimos anos a tecnologia de microencapsulação tem sido extensivamente aplicada à entrega de fármacos. Partículas poliméricas biodegradáveis têm recebido grande atenção como potenciais veículos de distribuição de drogas, devido a sua elevada aplicabilidade em campos terapêuticos e farmacêuticos, tais com: anti-inflamatório (BAYOMI, 2004), antibióticos (PANDEY, 2003) antitumoral (SHARMA, 1996), proteínas (NUJEN, 2001) e vitaminas (SHI, 2002).

Ao se utilizar a tecnologia de microencapsulação, muitos benefícios podem ser encontrados em relação a administrações de fármacos via oral. Este processo melhorara a estabilidade dos ativos diante as características físico-químicas do sistema biológico fornecendo uma barreira física para proteger os medicamentos que são susceptíveis a degradação frente a fatores, tais como: a acidez, alcalinidade, evaporação, calor, oxidação, luz ou humidade elevada (SZETO et al., 2002). Na literatura existem poucos relatos sobre a utilização da berberina em sistemas de liberação de drogas; um exemplo, é descrito por PANDEY et al., 2003, ao encapsular este composto em micropartículas de hidroxipropilmetil-celulose com posterior revestimento utilizando-se o poliacrilato Eudragit E100 como uma estratégia de mascaramento do sabor amargo da droga (SUNG, 2006).

A microencapsulação aumenta a eficiência terapêutica de drogas e minimiza danos ao organismo, quando se vincula liberação controlada e desempenho terapêutico. As drogas ou compostos microencapsulados superam as desvantagens da entrega da droga em rota convencional, incluindo baixa biodisponibilidade e compatibilidade, baixa absorção e meia-vida (REBECCA et al., 2012). Em termos moleculares, diversos eventos decorrentes do uso

contínuo da droga são atenuados em virtude do aumento da biodisponibilidade e da diminuição da não-direcionalidade aos receptores celulares por parte das drogas, que não participam efetivamente do conjunto de sinalização no sítio de ação (KANG et al., 2002).

Os métodos de preparos de microencapsulação podem ser separados em: químicos e físico-químicos. No processo de microencapsulação química por polimerização interfacial ocorre a formação de um polímero na interface entre duas fases líquidas (SINGH et al., 2005)

A parede de uma microcápsula é formada sobre a superfície de uma gota ou partícula pela reação de um monômero multi-funcional (alta reatividade) que é dissolvido no líquido de forma que ocorram nucleações com a mistura dispersa. Com quantidade suficiente para formação em uma fase aquosa, envolve-se a partir no meio reacional um agente de dispersão como uma amina, então, a reação de polimerização se processa cineticamente rápida à temperatura ambiente, fazendo com que se forme uma fina parede de microcápsulas (REBECCA et al., 2012; ROCHA et al., 2010; SHIMODA, 2001).

No processo físico-químico, a coacervação (separação de fases) foi inicialmente introduzido por Bungenberg de Jong e Kruyt em 1929. Foi definido como parcial dessolvatação de uma solução de polímeros. Nessa técnica a coacervação começa por adição de ácido ou sal (alteração do pH), em um material não-solvente para a dispersão, com a temperatura alterada gradativamente na emulsão, resultando na precipitação de uma parede polimérica com revestimento em torno de nucleadores de coordenação química, a fim de aumentar a dureza do revestimento das microcápsulas podem ser adicionado a solução polimérica agentes reticuladores, como: cloreto de cálcio (ATCHE, 2000; CHOI et al., 2009; SHAMSA, 1999).

Um sistema de entrega controlada de droga deve idealmente ser constituído por materiais poliméricos não tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis (PANDEY, 2003). Microesferas são um exemplo de tais sistemas que têm despertado bastante interesse da parte

acadêmica, por serem também utilizadas para a liberação prolongada de princípios ativos empregados na área farmacêutica, médica e da agricultura (HEJAZI, 2003).

Ao avaliarmos este sistema de liberação, nos deparamos com os processos de erosão, degradação e hidratação. Considerando-se inicialmente que a droga esteja homogeneamente misturada com o polímero no sistema de microencapsulação, dessa forma, a erosão e a degradação da parede polimérica pode diminuir na razão da distância entre as moléculas de droga na superfície das microesferas. Isso resulta na liberação do fármaco por ação do sistema enzimático ou de degradação química presentes no meio biológico (BANSODE et al., 2010).

Outro processo relevante reside na hidratação, que é geralmente mais rápida do que a erosão e a degradação da matriz polimérica das microesferas, devido as forças intermoleculares induzidas que aumentam a difusão e conseqüentemente a pressão interna do material aprisionado, ocasionando a liberação da droga por meio dos micro-poros formados na superfície das microcápsulas (JYOTHI, 2010). A matriz polimérica começa a ser corroída e degradada, mas as moléculas da droga encapsulados ainda se mantem no interior das microcápsulas até que seja fissionada a matriz polimérica (ROCHA et al., 2010).

Diversos são os polímeros estudados para servirem de matrizes poliméricas para os sistemas nanoestruturados. Esses polímeros podem ser retirados de produtos naturais de origem orgânica a exemplo polissacarídeos como quitosana, celulose, poliaminoácidos (CRUZ et al., 2011).

Para determinação do tipo de sistema de liberação é indispensável avaliar os parâmetros da biodegradação, biocompatibilidade, compatibilidade físico – química em relação ao fármaco e a via de administração. Assim identificar os possíveis efeitos da resposta imunológica, tóxica e após administrada deve-se ainda avaliar todo processo farmacocinético desde o metabolismo até a eliminação (GOODMAN & GILMAN 2004).

Biopolímeros como o alginato e a quitosana têm sido o alvo de estudos que investigavam as propriedades físico-químicas para utilização no encapsulamento de células, carregamento de fármacos e hidrogéis (LAWRIE, 2007), por serem de fácil degradação hidrolítica e enzimática, biocompatíveis e não tóxicos.

Um dos fatores que permitiram o desenvolvimento de biomateriais usando alginato e quitosana reside na possibilidade desses materiais formarem complexos polieletrólíticos por ligações iônicas, mas ainda pela interação entre os grupos orgânicos carboxílicos do alginato e amina da quitosana, formando uma matriz tridimensional conhecida como gel reticulado.

1.3 Alginato de Sódio

O alginato de sódio é um polímero natural, biocompatível, biodegradável e hidrofílico, também tem sido muito utilizado como material nas formulações para a entrega de droga, devido ao bioadesivamento, gelificação e pH tamponado (JUANG, 2002).

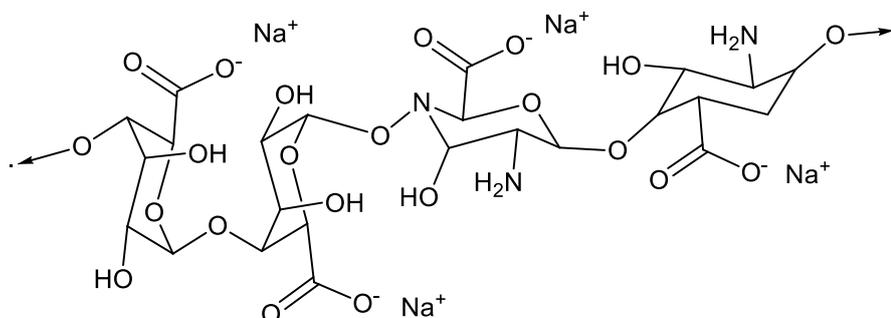


Figura 1: Fórmula estrutural simplificada de alginato de sódio.

O alginato de sódio pode formar hidrogéis com cátions polivalentes, tais como: Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Fe^{3+} (TIABOONCHAI, 2003). Normalmente, microcápsulas ou microesferas são obtidas com alginato por gotejamento diretamente à solução de alginato de sódio em solução aquosa de CaCl_2 (RAFFIN et al., 2003). J. Quan, et al 2013, desenvolveu microcápsulas de

alginate de sódio para a administração oral de hormônios e comparou a eficácia da microencapsulação com outros sistemas poliméricos atestando uma maior taxa de encapsulação em relação a outros polímeros (GOTOH; MATSUSHIMA; KIKUCHI, 2004). Em função de propriedades de excitação eletrônica do alginato, estudos com gama-cintilografia foram realizados para determinar a localização de microesferas no corpo de roedores (ratos), e após a administração oral no ensaio monitorado detectou-se a presença de microesferas marcadas no lúmen intestinal 4.0 horas após a administração oral (JYOTHI, 2010).

O alginato é um polissacarídeo composto de biopolímeros de blocos aniônicos ligados ao ácido glicurônico (L). Os sais de alginato mostram elevada afinidade para os íons metálicos mas, devido à sua tendência reativa em água podem apresentar diminuição da força mecânica (ATCHE et al., 2000; GASEROD, 1998).

1.4 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo composto principalmente, de poli (1-4)-2-amino-2-desoxi-d-glicopiranosose, com a síntese orgânica pode ser produzido por meio de desacetilação da quitina, que é amplamente difundida entre os invertebrados marinhos e terrestres e em formas inferiores do reino vegetal (GOTOH; MATSUSHIMA; KIKUCHI, 2004). A quitosana tem excelente reatividade natural para íons metálicos, devido às presenças de hidroxilas (OH^-) e dos íons amino (NH_2^-) (MODRZEJEWSKA, 1997). Esses grupos dirigentes servem como locais de coordenação ou de reação química em carbonos de Markonikov (ATCHE et al., 2000). A quitosana como reagente tem propriedades úteis para a síntese, por ser policatiônica além das propriedades não-tóxicas. (FUKUDA, 1999; KAMINNSKI, 1997; GASEROD, 1998).

A quitosana tem uma boa capacidade de interação molecular, no entanto, devido às modificações de interação de propriedades mecânicas físico-químicas fracas se torna pouco reativo em meio ácido. Além de alterar a configuração eletrônica, modificações físicas permitem a expansão da rede porosa devido à formação de gel, o que eventualmente diminui a cristalinidade da estrutura. As modificações químicas também podem aumentar a expressão das propriedades químicas, evitando a dissolução da quitosana em ácidos fortes e melhorando a sua resistência mecânica. Algumas das modificações químicas incluem a ligação cruzada utilizando um agente de ligação oxidante, promovendo a formação de um novo grupo funcional acetilado (JUNG, 2002; SUN, 2006). A reticulação química pode alterar a natureza cristalina da quitosana e aumentar a resistência de quitosano contra o meio ácido, alcalino e diminuindo à ação de agentes eletrofílicos fortes (CHATTERJEE, 2005).

A QS é um polímero que contém um grupo amino, o qual é solúvel em água, carregado positivamente, e pouco solúvel em meio levemente ácido (pH 6), a QS exibe mucoadesividade excelente em meio ácido, devido à ionização dos grupos amino (BAYOMI, 2004).

Pelo fato de ser um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, a QS tem sido proposta como um material atrativo para aplicações em: engenharia, biotecnologia e medicina. As indicações mais comuns são sua funcionalidade como meio complexante de íons metálicos (JUNG, 2002) para a formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida (PITTA-ALVAREZ, 2008) ou como material indispensável para a produção de matrizes de liberação controlada de droga (SARMENTO, 2007).

Por ser muco adesivo, QS aumenta o tempo de permanência da droga no local de absorção reduzindo a metade o tempo de eliminação da droga, e melhorando assim a biodisponibilidade da mesma (TIABOONCHAI, 2003). A QS é considerada um material seguro para o transporte de drogas catiônicas que circulam barreiras biológicas do meio ácido, por isso, pode fazer parte da composição de matrizes poliméricas para sistemas de entrega

controlada eventualmente microencapsuladas que necessitam permear um meio saturado de cátion hidrogeniônico (NO et al., 2002). Por ser um material promissor para a administração oral, quando as drogas em sistemas convencionais são consideradas de baixa biodisponibilidade, absorção ou quando sofrem significativa diminuição da concentração devido ao efeito metabólico de primeira passagem, a QS atenua esses fatores, que quando somatizados provocam aumento da toxicidade por doses elevadas. A adequação de matrizes poliméricas com QS pode minimizar a degradação da droga *in vivo*, aumentar a oferta farmacológica e reduzir os efeitos adversos decorrentes de elevadas doses (SRIAMORWSAK et al., 2008).

Ainda com relação a muco adesão pertinente a QS, cujo interesse científico reside em projetar formulações planejadas para sistemas de liberação controlada, em parte deriva da condição química desse polímero. A hidrofolicidade, por exemplo, que potencializa a capacidade de aderência durante o processo de formação da QS, advém da amina primária e dos grupos funcionais hidroxila que aumentam as formações de ligações de hidrogênio com OH⁻ e COOH (NGAH, 2006), além da cadeia linear da molécula que exhibe flexibilidade e confere a superfície características energéticas de moderada intensidade, fazendo que a conformação de QS dependa somente da força iônica o meio reacional. Esses fatores determinam as atividades de mucoadesão (SHIMODA et al., 2001)

Estudos realizados por La Torre e colaboradores mostraram que microesferas de QS em ensaios farmacológicos mantiveram a faixa terapêutica de Amoxicilina tornado-se um dos sistemas de entrega de drogas específicas do estômago. Embora perfis de liberação satisfatórios tenham sido obtidos para fármacos hidrofóbicos ou macromoléculas em microesferas (CHANG, 2004; CHATTERJEE, 2005; NGAH, 2006), o mesmo não ocorre para a liberação controlada de antibióticos hidrofílicos incluindo tetraciclina (CHANG, 2004) e ampicilina (JYOTHI et al., 2010) no suco gástrico (pH 1,0), de fato ocorre uma diminuição a

biodisponibilidade do material encapsulado (RAFFIN, et al., 2003; SUN, 2006). Com a ionização de grande quantidade de grupos amino, uma matriz de QS se torna um excelente meio higroscópico em ambiente ácido (GUIBAL, 2008). Assim, a microesfera de QS é altamente permeável para drogas de baixa massa molar gerando por exemplo, no estômago, um perfil de liberação pouco eficiente. Diferentes métodos têm sido relatados para modificar o processo de liberação de antibióticos hidrofílicos, incluindo alta densidade química cross-linking, reacetilação de quitosano (GUIBAL, 2008; SUN, 2006) e revestimento (SHIMODA, et al., 2001). No entanto, todos estes métodos reduziriam em alta escala a cadeia polimérica, a afinidade droga-receptor, bem como a quantidade de grupos amino que resultaria na perda de mucoadesividade (SARMENTO, 2007). É sabido que os pré-requisitos para uma boa mucoadesividade foram alta flexibilidade de cadeia principal do polímero e preservação de grupos funcionais polares (NGAH, 2006). A QS comercializada é derivada somente do exoesqueleto de crustáceos, como camarão, lagosta e caranguejo, por causa da grande quantidade disponível desse material como resíduo do processamento de alimentos marinhos.

O grupo amino presente na estrutura química da quitosana é o sítio ativo responsável pelas propriedades de reatividade pelos íons metálicos e compostos orgânicos (FUKUDA 1999, GUIBAL, 2008 e YAMURA et al., 2008).

A fim de aumentar o tempo de biodisponibilidade de alguns fármacos se desenvolvem sistemas em microescalas (grânulos, lipo e microesferas). A cobertura das microesferas pode ser ligada, também a drogas ou outros agentes de tratamento, como radioisótopos (RANG, 2007) e elementos fotosensibilizadores (RAFFIN et al., 2003).

Para a obtenção de um sistema com especificidade, busca-se construir uma plataforma de liberação de drogas contendo grupos químicos que conduzam o composto ao sítio de ação específico, além de ser um sistema de elevada capacidade de proteção de ataques do sistema fagocitário e químico de barreira. Por isso, em alcalóides, a estratégia de cobertura pode ser

uma alternativa viável para transportar moléculas de massa molar elevada e de potencial dielétrico alto uma vez que, o transporte de drogas está sujeito a ionização por interações eletrostáticas decorrentes da aproximação de grupos químicos eletrofílicos que alteram as cargas das drogas (SOUSA et al., 2008; SUN, 2006).

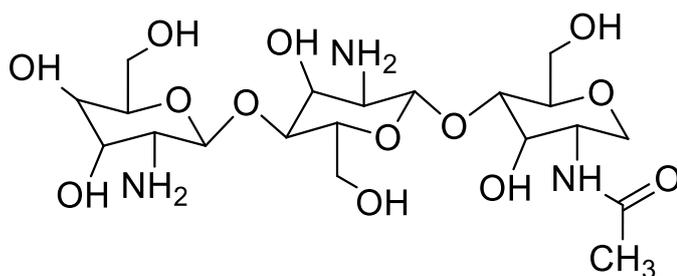


Figura 2: Fórmula estrutural simplificada de amino quitosana.

1.5 Nanopartículas de Ouro (AuNP)

As nanopartículas metálicas possuem propriedades distintas dos materiais à escala macroscópica, o que as torna elementos relevantes para diversas aplicações, em particular em (bio)sensores (por ex. ópticos e eletroquímicos), electrocatálise e no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos (DANIEL, 2004). Quando ouro sólido, em tamanhos muito diminutos (por volta de um bilionésio do metro), estão dispersos em meio líquido, são chamados de nanopartículas de ouro ou ouro coloidal (AuNPs). Estes materiais são estáveis e apresentam aspectos interessantes, como de propriedades magnéticas, óticas e eletrônicas todas relacionadas com seu formato e tamanho e afinidade com cadeias carbônicas ligadas a diferentes radicais, a aplicação na biomedicina e catálise também são marcantes (WEBER, 2012). Os métodos químicos são utilizados para a obtenção do ouro nanoparticulado, pois permitem a formação de partículas menos dispersas e de tamanho controlado. Essa reação foi,

inicialmente, observada por Faraday em 1857 e envolve a redução de um sal de metal na presença de um agente estabilizante (SHARMAA; PARKA; SRINIVASARAOA, 2009).

A utilização de nanomateriais vem do tempo da alquimia, através da obtenção e utilização de ouro e metais precisos coloidais para modificação da cor de vidros utilizados em cálices e, em vitrais de catedrais medievais (FREESTONE et al., 2007). A figura 3 tem-se a taça de Licurgo, constituída de sais de ouro. O efeito de óptico de variação de cor apresenta relação com o tamanho das partículas ouro na estrutura, que ao ser irradiada com fótons pode excitar elétrons em níveis quânticos nos estados tripleto e singleto.



Figura 3: Taça de Licurgo (KILLICK,1996).

A partir do momento que surgiu o microscópio eletrônico de transmissão, J. Turkevich e colaboradores (TURKEVICH,1951) pesquisaram uma variedade de métodos para a síntese de nanopartículas metálicas, seguidos por G. Frens, (FRENS, 1973) que desenvolveu métodos para controlar o diâmetro das nanopartículas de ouro mediado pela concentração do citrato. Dentre estes métodos encontra-se o de Turkevich modificado que foi aplicado na realização do produto apresentado. Este método consiste na redução de íons AuCl_4^- por citrato em meio aquoso. Essencialmente, sendo um processo apresentado como uma mistura de ouro e citrato, em meio aquoso, sob aquecimento e agitação. Mas, alguns detalhes no preparo tornam se

importantes já que influenciam na distribuição do tamanho das nanopartículas. São estes os detalhes: a velocidade de agitação, a temperatura, a razão entre o ouro e o citrato e a ordem de agitação dos reagentes.

O citrato além de promover a redução também atua como um estabilizante por meio da repulsão eletrostática (KIMLING et al., 2006). A presença de uma espécie que se adsorve na superfície das AuNPs (que pode ser o próprio redutor, surfactantes, tióis, polímeros) em solução, permite estabilizar e funcionalizar as Nps formadas; a sua ação exerce um papel importante no controle da agregação, do tamanho, da forma e da orientação cristalográfica superficial das Nps (FERREIRA, 2011). As reações (figura 4) são apresentadas as equações de redução do HAuCl_4 em ouro metálico.

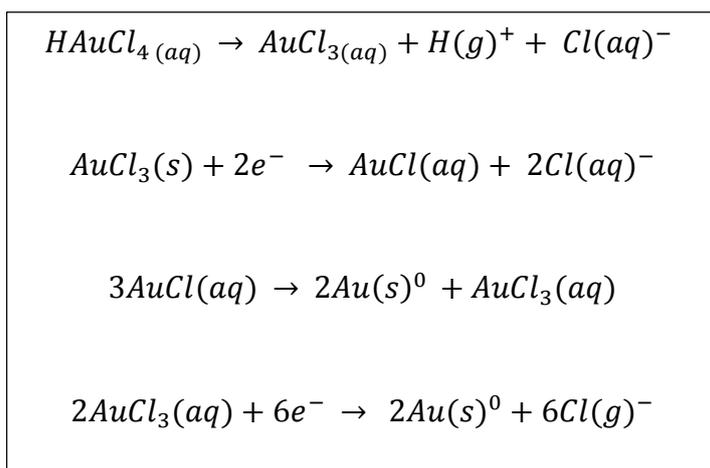


Figura 4: Equações de redução do HAuCl_4 a ouro metálico.

Segundo Turkevich et al. (1951), o citrato age como um agente de complexação de íons Au^+ , formando uma macromolécula polimérica. Ocorrendo a oxidação do citrato de sódio em dicarboxil-acetona, com liberação de dióxido de carbono, cátion hidrogênio e elétrons, nessas circunstâncias os íons de Au^+ são reduzidos a Au^0 , na figura 05 tem-se um esquema dessa reação química com o citrato reagente atuando como organizando da nucleação e facilitando o choque randômico entre átomos de ouro. Ao passo que os átomos de ouro se

unem, a proximidade do citrato e da dicarboxil-acetona mais íons são formados mono e trivalente para o átomo de ouro.

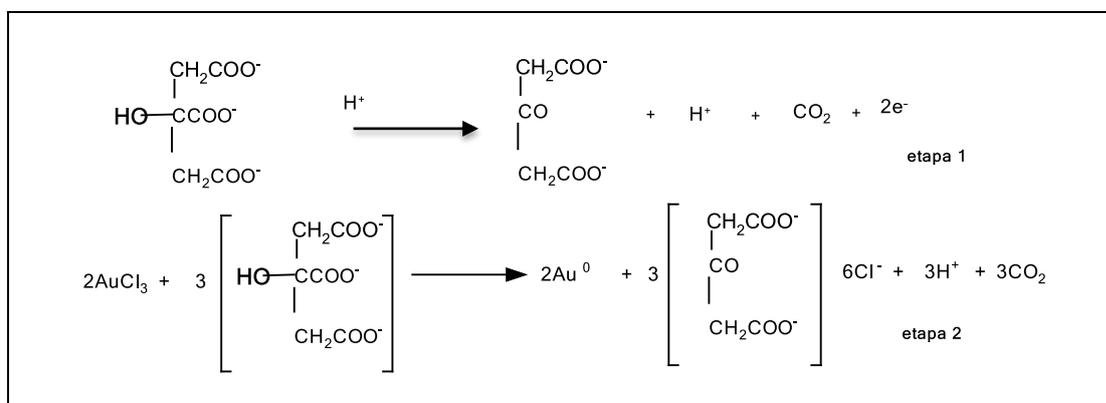


Figura 5: Equação de redução do HAuCl_4 por íons citrato: nanopartículas de ouro (TURKEVICH,1951).

Outro método sintético que foi desenvolvido por Brust e colaboradores somou-se ao elenco dos trabalhos que alavancaram o desenvolvimento dos estudos experimentais das nanopartículas de ouro, por permitir a obtenção de nanopartículas com um tamanho reduzido e uma estreita distribuição de tamanhos. Tal método foi inspirado na síntese de Faraday, utilizando NaBH_4 como agente redutor e alcanotióis de cadeia longa como agentes passivantes em um meio bifásico de tolueno e água (BRUST,1994).

As AuNPs apresentam propriedades óticas e eletrônicas destacáveis tornando-as de grande importância em aplicações (SPERLING,2008), podem constituir diferentes materiais, como *quantum dots*, por apresentar inércia elevada as AuNPs são consideradas de menor toxicidade. Estudos revelam que o tamanho do ouro nanoparticulado interfere na cor da solução, pois quando o diâmetro está em torno de 20 nm, a cor que caracteriza a amostra é vermelho rubi e com o aumento do tamanho a coloração da suspensão passa pelo roxo e azul.

Em 1908, o físico alemão Gustav Mie desenvolveu um elegante conjunto de equações para descrever a interação de ondas eletromagnéticas com uma partícula metálica

esférica (Mie et al., 1908). Esta interação da luz com as partículas pode ser explicada através dos plasmons que estão na superfície das partículas. Plasmons são oscilações coletivas de elétrons livres, isto é, pacotes de energia que flutuam sobre a superfície de um metal, neste caso o ouro, e interferem em propriedades eletrônicas e ópticas (figura 6). Baseado em tais informações e na relação destas com dispersão de radiação eletromagnética por partículas esféricas (Teoria de Mie) o ouro nanoparticulado sofre absorção em torno de 520 nm se suas partículas estiverem em torno de 20 nm de diâmetro. Mas, para que isto ocorra, as nanopartículas de ouro não podem possuir qualquer tipo de interação entre si. Sendo assim, como já supracitado, existe a necessidade de uma camada de modificação superficial eficiente que impeça a agregação e estabilize a partícula eletrostaticamente. Caso contrário, a partícula agregará e uma nova banda a 650 nm será exibida na espectroscopia UV-Vis.

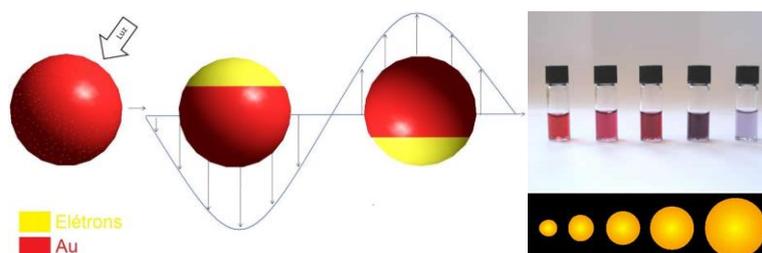


Figura 6: Frequência de plasmon e dependência da cor tamanho das partículas (TOMA,2010).

A superfície destas nanopartículas de ouro é uma espécie de plataforma altamente funcional quando se refere à conjugação de moléculas orgânicas como os tiolatos, os ditiolatos, as aminas entre outros. Estas moléculas conjugadoras são responsáveis pela estável dispersão das moléculas em meios aquosos e orgânicos. Já existem muitos estudos que apresentam as nanopartículas de ouro modificadas superficialmente com mercapto derivados (JINLONG,2007).

Um elevado número de biomoléculas tem sido conjugadas a nanopartículas, como por exemplo AuNPs unidas a oligonucleotídeos a fim de estruturar a complementariedade de

pares de bases do DNA. A partir daí poder-se-ia fabricar biossensores para detectar anomalias celulares, doenças congênitas e alterações e disfunções nucleares.

Pesquisas utilizam conjugações de biomoléculas e nanoestruturas por meio das técnicas de adsorção eletrostática, ligação covalente e até microencapsulações aos sistemas poliméricos. (ROSI et al., 2006). AuNPs podem ser biofuncionalizadas a partir de interação química na superfície, com reagentes tióis proveniente do aminoácido cisteína (AUBIN, 2005). Uma outra abordagem é utilizar nanopartículas de ouro como carreadores de drogas. Neste contexto as drogas podem ser associadas por atração eletrostática (TOMA, 2010) ou ligadas covalentemente a superfície da nanopartícula (VIGDERMAN, 2003).

Na figura 7 é apresentado um esquema ilustrativo de Conde e colaboradores (CONDE et al., 2014). Dentre as potencialidades de nanomateriais cabe destacar as aplicações médicas desde o imageamento até o diagnóstico, passando pela liberação controlada de fármacos (BARRETO et al., 2011). A partir de processos de funcionalização química é possível ligar na superfície das AuNPs radicais orgânicos, aminoácidos e proteínas, em decorrência da interação covalente e iônica que esse metal exibe diante aos ligantes aniônicos e catiônicos. No esquema a seguir tem-se algumas das possíveis funcionalizações já realizadas na superfície das AuNPs.

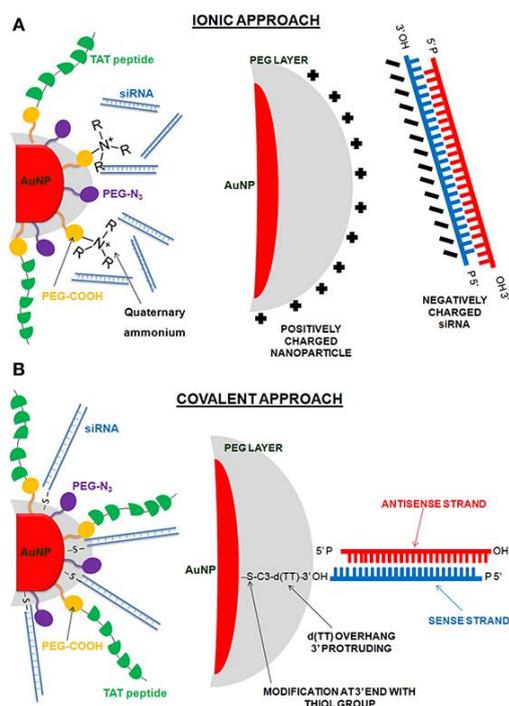


Figura 7: Esquema ilustrativo das ligações a superfície da AuNP (iônica e covalente). Conde et al. (permissão de uso concedida)

1.6- Fármacos

1.6.1-Berberina

O composto berberina BS Figura 8, é um alcalóide de *Hydrastis canadensis L.*, erva chinesa *Huanglian*, massa molar 320,55 g/mol e fórmula molecular C₂₀H₁₈O₃N amplamente usada na medicina tradicional oriental, principalmente a chinesa, como um antimicrobiano no tratamento da disenteria e diarreia infecciosa (JUNG et al., 2008). Seus derivados tetrahydroberberina e 8-oxoberberina apresentam efeitos cardiovasculares com efeito inotrópico positivo, cronotrópico negativo e anti-arrítmico, além de propriedades vasodilatadoras (KIM, 2009). A BS por classificação taxonômica botânica é um alcalóide isoquinolínico, amplamente distribuída em plantas medicinais, encontradas também no

cultivar natural do cerrado (FUKUDA, 1999), tais como: *Coptis chinensis* (coptidis rhizoma) e Baical solidéu Raiz (*Radix scutellariae*), que contêm uma grande quantidade de BS e protoberberinas (CHOI et al., 2008).

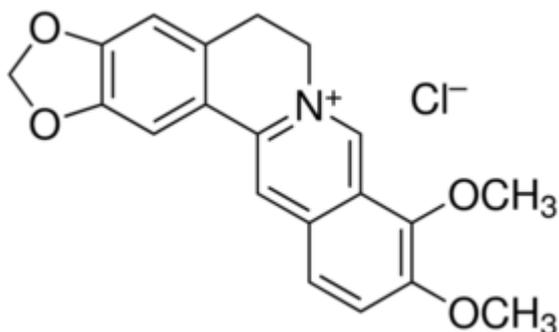


Figura 8: Fórmula estrutural da berberina

Fonte: Chemspider ID: 633.65-8. <http://www.chemspider.com>

É encontrada majoritariamente nas raízes, rizomas, e casca do caule de uma série de importantes espécies de plantas medicinais, incluindo *Berberis vulgaris* (barberry), *Hydrastis canadensis* (hidraste) (*Ranunculaceae*), *Coptis chinensis* (*Coptis* ou goldenthread) (*Ranunculaceae*), *Arcangelisia flava* (*Menispermaceae*), *B. aquifolium* (*Oregon uva*) e *B. aristata* (açafão árvore).

Desde o século passado, BS tem sido amplamente investigada e foi estudada por apresentar grande variedade de atividades farmacológicas em aplicações biomédicas tais como: ação antimicrobiana, antihelmíntica, anti-inflamatória e anti-oxidantes (FUKUDA, 1999 e JUNG et al., 2008). A Berberina (*Berberis vulgaris* L. família *Berberidaceae*) tem origem na Ásia e na Europa, é uma planta bem conhecida pela medicina tradicional. Os frutos foram utilizados também como aditivo alimentar pela coloração vermelha intensa. A planta é

um arbusto, 1-3 m de altura, espinhoso, com madeira amarela, flores amarelas pendentes sucedidas por frutas vermelhas oblongos (SHAMSA, 1999).

As partes do *B. vulgaris*, incluindo a raiz, casca, folhas e frutos têm sido utilizadas na medicina popular por um longo tempo no Irã e em outros países. Na pesquisa farmacológica, existem muitos estudos que atestam efeitos terapêuticos a partir de alcalóides isoquinolínicos do gênero *Berberis*.

Berberina pode aumentar a liberação de mucina, agindo diretamente em células secretoras de mucina das vias respiratórias, sugerindo ao agente para um estudo mais aprofundado para a possível utilização como expectorante suave durante o tratamento de doenças das vias respiratórias crônicas (LEE, 2003).

1. .2-Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas, isolado a partir de meio de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetis var caesius*, relatado como de uso em oncologia humana (THORN et al., 2011). A DOX apresenta um anel de antraciclina na estrutura química, que se intercala entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA nas fases de transcrição e replicação, produzindo radicais livres redutores que pela reatividade, lesionam a membrana celular, o DNA e o RNA. Por apresentar seletividade por receptores muscarínicos, tipo *M2*, encontrados nos átrios cardíacos podem induzir miocardites, daí a importância do controle de dose e ou ajuste.

A DOX, cuja fórmula química é $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$ e possui massa molar 579,95 g/mol tem sua principal ação citotóxica mediada por um efeito na topoisomerase II, enzima do grupo do tipo DNA girase, cuja atividade é bem intensa na divisão celular. Durante a replicação da hélice do DNA, ocorre rotações reversíveis em torno da forquilha de replicação a fim de evitar que o novo filamento fique segregado em fibra mitótica (RANG & DALE, 2007). A enzima

que é responsável pelo evento de recolher a molécula de DNA é topoisomerase II, a DOX fica distribuída no DNA, e seu efeito é basicamente estabilizar o complexo ligante DNA-topoisomerase II após a divisão dos filamentos, cessando e inibindo a fase de síntese do RNA.

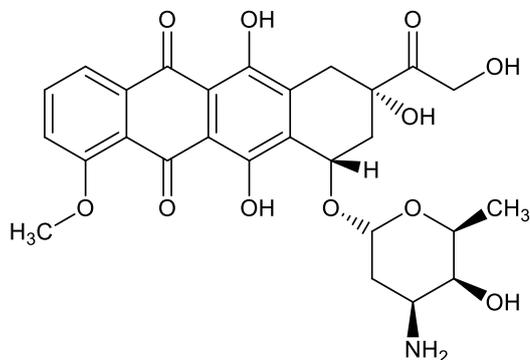


Figura 9. Fórmula estrutural simplificada de Cloridrato de Doxrrubicina

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elaborar um sistema sinérgico contendo o fármaco berberina em matriz polimérica mista na forma de microesferas e associar nanopartículas de ouro contendo doxorubicina, para aplicações em nanobiotecnologia.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter microesferas poliméricas mistas de alginato recoberta com quitosana com berberina.
- ✓ Avaliar características físico-químicas e morfológicas das microesferas poliméricas mistas.
- ✓ Sintetizar Nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich com alterações associando a doxorubicina por interação eletrostática e covalente.
- ✓ Funcionalizar a superfície das nanopartículas de ouro.
- ✓ Caracterizar o sistema microestruturados e nanoestruturado frente aos aspectos espectroscópicos, térmicos, de tamanho e de morfologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

A seguir a listagem de equipamentos utilizados na execução da pesquisa:

- Agitador de tubos vortex, marca Logen Scientific[®], modelo LSM56-III e marca IKA[®] modelo labdance;
- Balança analítica marca Marte[®] modelo AY 220;
- Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco[®] modelos CFLV 09 e CFLV 12;
- Centrífuga de bancada para microtubos marca Hettich Lab technology[®] modelo Mikro 200R e centrífuga de bancada para microtubos marca Eppendorf[®] modelo MiniSpin;
- Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific[®] modelo LS61- 220;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®] modelos T25, equipado com elementos de dispersão S25N-25F ou S25N-18G;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®] modelo T10, equipado com o elemento de dispersão S10N-5G;
- Espectrofotômetro de fluorescência marca Hitachi High- Technologies Corporation[®] modelo F-7000.
- Espectrofotômetro Infravermelho com transformada de Furier marca Shimadzu[®] modelo IRPrestige -21;
- Espectrofotômetro para microplacas marca Spectramax[®] modelo M2;

- Espectrofotômetro UV-vis marca Hitachi High-Technologies Coporation[®], modelo U-3900H;
- Estufa Incubadora de CO₂ marca Thermo Scientific[®], modelo 8000 WJ;
- Medidor de tamanho e potencial zeta, Zetasizer Nano ZS Series, marca Malvem Instruments Limited[®]
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µl e 100-1000 µL, marca Kasvi[®], modelo Ecopipette;
- Microscópio Eletrônica de Varredura FEI QUANTA 250 A[®];
- Microscópio Eletrônico de Transmissão, marca JEOL; modelo JEM 1011;
- Metalizador, marca LEICA, modelo EM SCD 500;
- Aparelho instrumental para medida simultânea da análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TGA, marca Shimadzu[®], modelo DTG-60A ;
- Aparelho para análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) marca Shimadzu[®] modelo DSC-60A.

3.2 Reagentes

Utilizou-se dos reagentes abaixo listados para a produção, montagem, caracterização e de outras análises das AuNPs e dos sistemas. Os materiais inicialmente propostos e utilizados para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados sem prévia purificação, exceto quando indicados:

- Berberina (BS MM 320,54 g/mol de Sigma Chem.Co.);
- Alginato de sódio (MM: 584,44 g/mol Merck);
- Quitosana (Sigma Chem. Aldrich);
- Cloreto de cálcio (MM: 116,44 g/mol, Vetec Química Fina[®]);
- H₂AuCl₄.3H₂O (dinâmica, P.A.);
- Citrato de sódio (Sigma Aldrich),
- Ácido tioglicólico (Merck),
- Ácido acético (C₂H₄O₂, M.M 60.04 g mol⁻¹ Dinâmica, P.A.)
- Doxorubicina (Sigma);
- EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) (Sigma);
- NHS (N-hidroxisuccinimida) (Sigma),
- Goma gelana (Química fina[®]).
- Ácido clorídrico 32% P.A., HCl, MM 36,45, teor entre 31 a 33%, 1,15kg/L, marca Vetec Química Fina[®];
- Álcool etílico P.A ACS, C₂H₆O, MM 46,06 g/mol, dosagem mínima 95,0%; densidade 0,81 g/mL, marca Vetec Química Fina[®].

3.3 Soluções

Todas as soluções listadas a seguir foram preparadas a partir de diluições de soluções estoques:

- Solução aquosa de H₂AuCl₄.3H₂O 0,1% em massa;
- Citrato de sódio 1% ; Ácido tioglicólico (TGA) 5 m mol. L⁻¹;

- Berberina (BS) [1,2 mmol.L⁻¹]. Concentração calculada através da absorvidade molar. Foram realizadas diluições em água sucessivas vezes para formar as concentrações de 10⁻³ até 10⁻⁸ mol.L⁻¹ para construção da curva de calibração.
- Doxorubicina (DOX) [880µ mol.L⁻¹] em metanol. Concentração calculada através da absorvidade molar.
- Solução aquosa estoque de 0,3 mol. L⁻¹ de EDC
- Solução estoque aquosa de 1,7 mol.L⁻¹ de NHS
- Soluções aquosas de álcool polivinílico (PVA) nas concentrações m/v de 7% e 10%;
- Solução de ácido acético (C₂H₄O 7% Dinâmica);
- Tris (hidroximetil)fosfina)+D/L-alanina (THPAL) foi sintetizado seguindo a metodologia descrita (Int J Green Nanotechnol Biomed. 2009 Jan 1; 1(1): B53–B59.doi:10.1080/19430850902983848). A solução de tri(hidroximetil)phospina (4mmol) em água é adicionada a uma solução aquosa de 12mmol de D-Alanina. Esta solução é deixada em atmosfera inerte de N₂ por 1 hora, sendo o solvente removido a vácuo e lavado com metanol e seco. O produto obtido foi utilizado em concentração estoque de 1,4mM em água.

A seguir, em ordem crescente de complexidade, nomeou-se os materiais de partida (soluções) e suas combinações em sistemas 1 à 10, conforme apresentado na tabela a seguir.

Tabela 1: Sistema em ordem crescente e/ou soluções ou microesferas.

Sistema 1	Solução aquosa de Berberina (BS)
Sistema 2	Solução aquosa de Doxorubicina (DOX)
Sistema 3	Solução nanoparticula de ouro e citrato (AuNPcit)
Sistema 4	Solução nanoparticula de ouro e citrato e doxorubicina (AuNPcit+DOX)
Sistema 5	Solução nanopartícula de ouro modificada acoplada com EDC/NHS (AuNP+EDC/NHS)
Sistema 6	Solução nanopartícula de ouro modificada acoplada com EDC/NHS doxorubicina (AuNP+EDC/NHS+DOX)
Sistema 7	Microesfera (bead) de alginato e quitosana (bead vazia)
Sistema 8	Microesfera (bead) de alginato e quitosana e berberina (bead BS)
Sistema 9	Microesfera (bead) de alginato e quitosana e berberina (bead BS)+ (AuNPcit+DOX)
Sistema 10	Microesfera (bead) de alginato e quitosana e berberina (bead BS) + (AuNP+EDC/NHS+DOX)

3.3.1 Preparo das soluções estoques para o preparo dos sistemas 1 e 2.

Inicialmente foi preparado a solução estoque de berberina com 50 ml de água ultrapura, 0,038 g de BS sendo a concentração obtida de 1,2 m mol/l por meio da relação e equação a seguir:

$A = \epsilon \times b \times C$ (**Lambert-Beer**); onde A é absorvância da amostra (344 nm); ϵ é o coeficiente de extinção molar (4.209 M cm^{-1}); b caminho ótico e C a concentração.

O procedimento para o preparo da solução de Doxorubicina ϵ é ($12,500 \text{ M cm}^{-1}$) em metanol a 480nm sendo estoque de 1,4mM.

3.3.2 Preparo das nanopartículas de ouro (AuNPcit) dos sistemas 3 e 4.

As AuNPs foram obtidas utilizando o método proposto por Turkevitch e cols. (1951), porém com algumas alterações. Inicialmente foi pipetado um volume de 1000 μ L de solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,2% em 25 ml de água ultrapura e transferido para um béquer. Posteriormente, sob aquecimento até aproximadamente 100°C e agitação constante foi adicionado 300 μ L de solução de Citrato de Sódio 1%. O sistema foi mantido em agitação e aquecimento, sendo observadas alterações na coloração da solução até chegar a Vermelho Rubi. Nesse momento, suspendeu-se a agitação e o aquecimento. O produto obtido foi uma suspensão coloidal de nanopartículas de ouro (AuNP) preparadas com citrato. Estas nanopartículas são chamadas de AuNPcit. O sistema 4 foi obtido pela adição de 880 μ mol/l de solução estoque de DOX, sendo esta agitada a temperatura ambiente por 40-60 minutos. Desta forma a associação da doxorubicina com as nanopartículas formadas.

3.3.3. Produção das Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro foram obtidas de maneira satisfatórias de acordo com o estipulado pelo método de Turchevich (sistema 3-4). Além deste método foi utilizado uma modificação na produção das nanopartículas utilizando outro agente redutor (THPAL) e agente estabilizante (goma gelana). A partir desta nanopartícula modificada foi realizada o acoplamento EDC/NHS para posterior ligação de doxorubicina a esta nanopartícula. A figura 13 tem-se uma fase da produção de AuNPs pela metodologia de Turkevich.

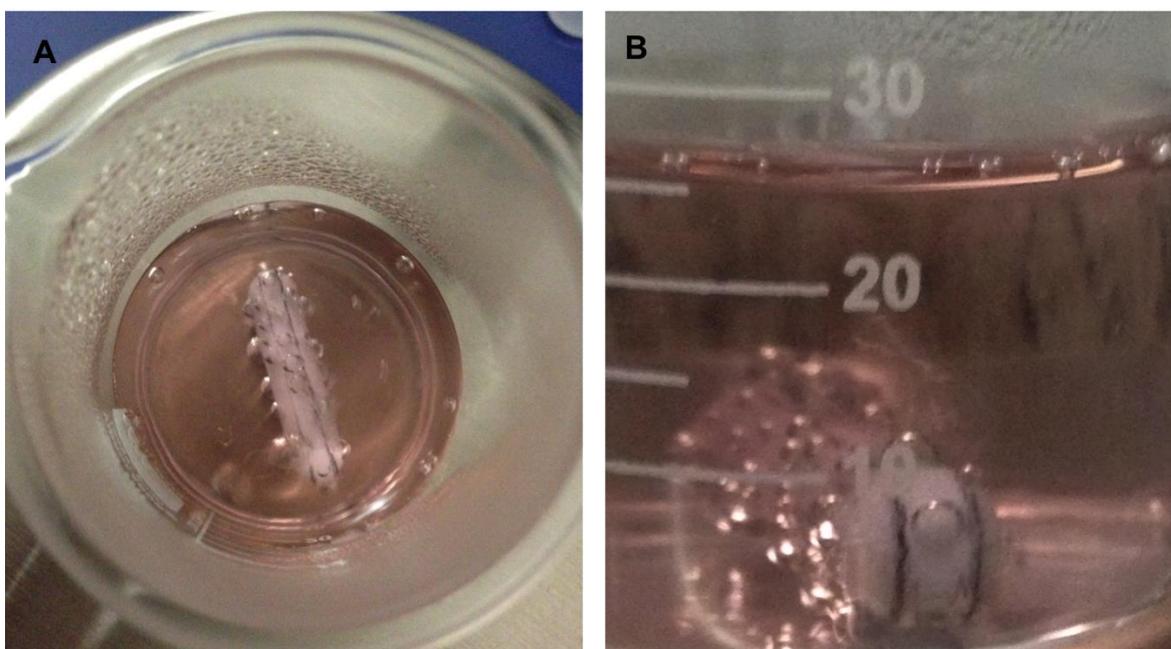


Figura 13: Preparo das nanopartículas de ouro pelo método Turchevich.

Na preparação de nanopartículas de ouro, foi obtida uma solução coloidal vermelha altamente estável de nanopartículas de ouro, sendo que, neste caso, a estabilidade desta

suspensão é devida à presença de íons citrato que estão adsorvidos às superfícies das nanopartículas (SPERLING et al., 2008).

3.3.4 Preparo das nanopartículas de ouro (AuNPmod) dos sistemas 5 e 6.

As AuNPs modificadas foram obtidas utilizando THPAL, como agente redutor e adicionado goma gelana como estabilizante. A partir desta formulação foi realizada o acoplamento EDC/NHS para posterior ligação da doxorubicina. Inicialmente foi pipetado um volume de 400µL de solução aquosa de H₂AuCl₄.3H₂O 0,2% em 25 ml de água ultrapura contendo 0,02g de goma gelana e transferido para um béquer. Posteriormente, sob aquecimento até aproximadamente 100°C e agitação constante foi adicionado 200 µL de solução de [1,4mmol/l] THPAL. O sistema foi mantido em agitação e aquecimento, sendo observadas alterações na coloração da solução até chegar a Vermelho Rubi. Nesse momento, suspendeu-se a agitação e o aquecimento. O produto obtido foi uma suspensão coloidal de nanopartículas de ouro modificada (AuNPmod). Esta solução foi deixada esfriar a temperatura ambiente e a partir desta foi retirada uma alíquota de 5mL onde foi 10 µL de EDC [0,3M] e 10 µL de NHS [1,7M] . Esta solução foi nomeada de sistema 5. O sistema 6 foi preparado a partir de 3,0mL da solução do sistema 5 adicionado 200 µL de solução de DOX.

3.4 Preparo das Microesfera bead do sistema 7 e 8

O sistema 7 é constituído da formulação polimérica alginato e quitosana cujas características físico químicas mostraram-se ser mais estáveis. Assim, para composição do sistema 8 utilizou-se a base de preparação do sistema 7 com a adição do fármaco.

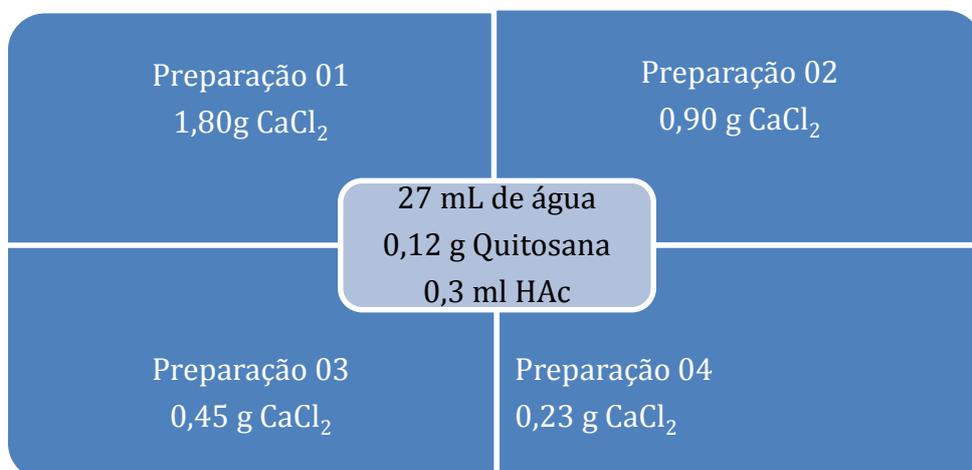
3.4.1 Preparo das Microesfera bead do sistema 9 e 10

A partir de microesfera (bead) secas do sistema 8 foram obtidas os sistemas 9 e 10 de mesma maneira. Brevemente, em um eppendorf foi adicionado 2,0 mg de microestrutura do

sistema 8 e adicionou 2,0mL da solução do sistema 4 obtendo-se assim o sistema 9. No caso do sistema 10, de maneira similar adicionou-se 2,0 mL do sistema 6.

3.4.2 Redução da concentração de CaCl_2 (agente reticulante).

Utilizando um sistema de adição adaptado ao proposto por Ki-Seong e colaboradores (KI-SEONG, 2003) em um béquer é adicionado a solução 1 e em outro a solução 2. A solução 2 é colocado sob agitação magnética e com o auxílio de uma seringa contendo a solução 1 e adicionada por gotejamento a solução 2 para a formação das Microesfera (bead) de alginato e quitosana. A partir de tentativas de ser obter microesferas mais estáveis quanto a fase de agregação, coloração e forma foram realizadas modificações nas concentrações do agente reticulante adicionado as soluções de quitosana, a partir de 4 (quatro) preparações conforme o esquema a seguir:



A seguir é apresentado o preparo das microesferas por gotejamento, onde na Figura 11-A e B são mostrados as beads sendo preparadas. Já na Figura 12 A e B são apresentadas as microesferas quando secas e entumescidas.

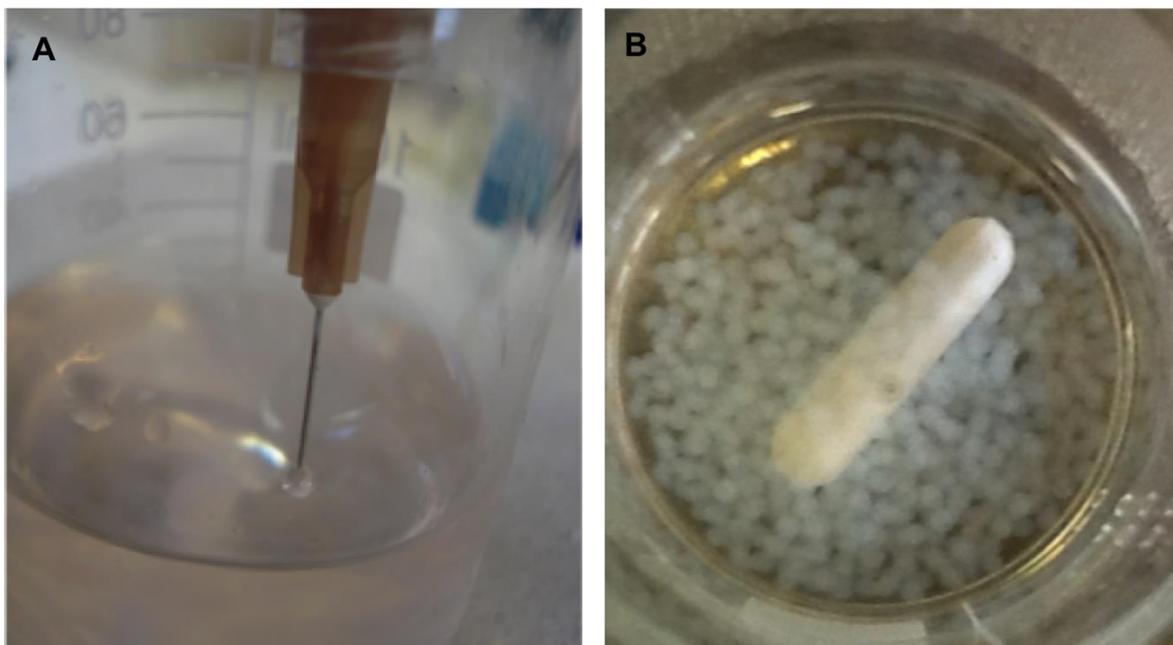


Figura 11: a) Gotejamento do gel de Alginato b) Beads no agitador magnético após o gotejamento.

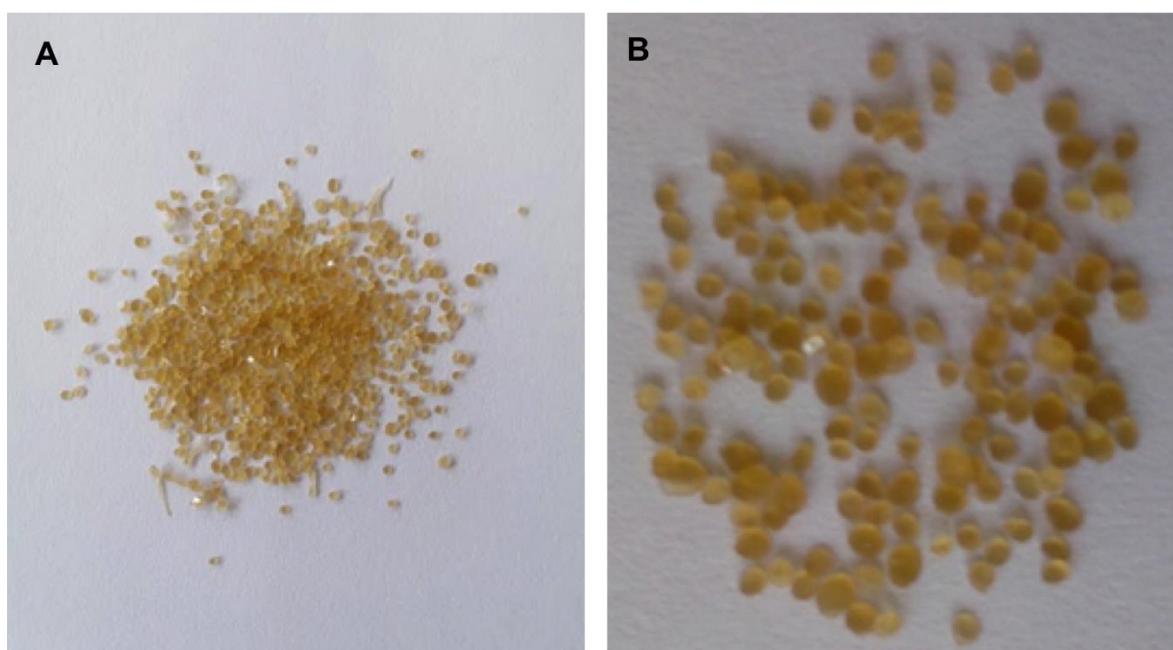


Figura 12 a) Beads secas b) Beads entumescidas na preparação 02.

De acordo com os parâmetros estudados, a formulação que fornece uma característica mais adequada (estabilidade) foi utilizada a apresentada na Tabela 3. Esta foi a formulação utilizada nos ensaios de caracterização.

O método de preparo das Microesfera (bead) de alginato e quitosana e berberina foi selecionado a partir da estabilidade das microesferas em solução de quitosana. A partir da secagem das microesferas procedeu-se, com a determinação da quantidade, tamanho e morfologia das microesferas (bead) de alginato e quitosana.

As Microesfera (bead) de alginato e quitosana foram analisadas inicialmente, logo, após a secagem para então proceder as análises a seguir:

- a) Microesfera (bead) de alginato e quitosana: Imagem em câmera fotográfica sem a folha milimetrada (utilizando métodos de análise como imageJ ou MATLAB[®]) medindo os tamanhos com o auxílio de um paquímetro.
- b) Microesfera (bead) de alginato e quitosana: através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.5 Caracterização dos sistemas

Em relação aos procedimentos de caracterização realizados nesse trabalho enfatizou-se análises espectroscópicas, calorimétricas de NPs, do conjunto de microesfera polimérico, a partir da constituição química de cada componente. Foram feitas medidas de distribuições de tamanho das amostras por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz. A determinação da carga superficial das NPs foi efetuada com medidas do potencial zeta, avaliação morfológica dos sistemas de matriz polimérica e de NPs, com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/SEM, Scanning Electron Microscopy).

3.5.1 Medidas Espectroscópicas

3.5.1.2 Espectroscopia FTIR

Espectros de infravermelho de berberina na forma livre, no sistema de microesfera e na matriz polimérica pura foram realizados em modo transmissão utilizando-se um espectrofotômetro FTIR (Fourier Transform Infrared), modelo IR Prestige 21, marca Shimadzu®. Para leitura foram elaboradas pastilhas salinas de brometo de potássio (KBr, Shimadzu®, JPN) com massa média de 31,0 mg (10 microesferas) preparadas com aproximadamente 5.5% de analito, prensadas manualmente a 80,0 kN por 3,0 minutos. Os espectros foram registrados utilizando-se 32 registros com resolução de 4,0 cm⁻¹ na região compreendida entre 4000- 400 cm⁻¹. Os dados foram tratados com o software IR Solution 1,50[®] e colocados na forma de gráfico no programa GraphPad Prism 6.0.

3.5.1.3 Espectroscopia de Absorção Molecular – Uv-vis

Espectros de absorção eletrônica dos sistemas em estudo foram obtidos valendo-se de um espectrofotômetro UV-vis (ultra-visível) de duplo feixe, duplo monocromador, com fotomultiplicador da marca Hitachi®, modelo 3900H. Para efeito de leitura das medidas ajustou-se a fenda para passagem de luz 2,0 nm, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e temperatura constante de 37,0 °C. Em princípio, a linha de base era obtida para posteriormente realizar as medidas de absorbância por meio do modo de varredura dentro da faixa espectral de 200,0 a 800,0 nm, com velocidade de escaneamento de 600 nm/min. Os dados obtidos eram tratados com o software UV Solutions 3,0[®] e transferidos para o programa GraphPad 6.0[®].

3.6 Análises Térmicas

3.6.1 Termogravimétrica/Diferencial Simultânea (TGA/DTA).

Para aquisição das curvas TGA/DTA, as amostras com massa entre 3,0 e 4,0 mg foram medidas e colocadas em cadinho de platina. Os experimentos foram efetivados em sistema de análise térmica e termogravimétrica Shimadzu DTG -60A, com condição de atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20,0 mL. min⁻¹ e razão de aquecimento de 5°C. min⁻¹, no intervalo de temperatura de 35° C a 400,0°C. O equipamento de TGA/ DTA foi calibrado previamente utilizando como padrão oxalato de cálcio monohidratado conforme norma ASTM 1582-93. As curvas obtidas foram tratadas usando o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa de construção de gráficos GraphPad 6.0[®].

3.6.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Na obtenção do ensaio de DSC (Differential Scanning Calorimetry), amostras contendo massas de 3 mg a 4 mg foram cuidadosamente medidas e transferidas para um cadinho de alumínio que foi posteriormente selado por meio de uma prensa. Os ensaios foram realizados no equipamento da marca Shimadzu[®] modelo DSC-60 A sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20,0 mL. min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0 °C . min⁻¹, no intervalo de temperatura de 35,0 ° a 400,0 ° C. O equipamento DSC foi anteriormente calibrado com índio metálico (pureza superior a 99,98%; e temperatura de fusão igual a 156,4°C). A caracterização dos eventos térmico dos sistemas foram identificados nas curvas obtidas que foram tratadas utilizando o software TA-60WS e plotadas no programa GraphPad 6.0[®].

3.7 Tamanho, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão

Para realizar a caracterização dos parâmetros de distribuição de tamanho, e potencial zeta e índice de polidispersão foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano Series, marca Malvern Instruments Limited, Nano ZS[®]. O equipamento possui fonte de luz (laser vermelho de 5 mW, He-Ne, com comprimento de onda 630 nm) e as medidas foram realizadas com detector posicionado em ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência. Na determinação do potencial zeta das AuNPs 1,0 mL da solução preparada para medida de tamanho foi transferida para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas. Adicionou-se as amostras em uma cubeta com eletrodos capazes de detectar a diferença de potencial na amostra. As medidas foram feitas com a adição de 30µl da solução em estudo em 1 mL de água ultrapura com a configuração do equipamento alterada para do modo size para o modo zeta. Mantendo-se temperatura em torno de 25° C e tratamento de dados com o software Zetasizer 6.20[®].

3.8 Análise Morfológica dos sistemas

Para realização das imagens e medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizou-se as beads dos sistemas 7,8,9 e 10 anteriormente secas na estufa a 35 °C. Após 30 minutos as amostras, cerca de 1 mg de cada sistema, foram inseridas na superfície de um suporte de alumínio (stubs) sob uma fita adesiva dupla –face, onde foram metalizadas em atmosfera de argônio. Para tal procedimento utilizou-se um equipamento da marca Balzers[®], modelo SCD-050. As amostras foram estudadas e fotografadas em aumentos iniciados em 250 a 35.000 vezes, com tensão de aceleração de elétrons de 20,0 kV no modo detecção de elétrons secundários. Durante a aquisição das imagens no equipamento do MEV, também foram realizados registros nos espectros de energia dispersiva (EDS, Energy Dispersive Spectroscopic).

O tamanho das beads, foram mensurados a partir das imagens obtidas no microscópio por meio do tratamento com o software ImageJ[®], versão 1.48r, fornecido e disponível pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH, National Institutes of Health) no sítio eletrônico <http://imagej.nih.gov/ij/>. Usando escala fornecida pela resolução da imagem pode-se estimar a área das partículas no estado sólido, e obter a média da distribuição do tamanho.

A metodologia proposta nesta dissertação foi baseada na revisão de artigos da literatura acerca do mesmo assunto, com a proposta de construção de sistema misto contendo polímeros naturais (macro-estrutura “Bead”) contendo partículas metálicas de ouro (nanoestrutura) associadas a berberina e doxorubicina.

De maneira a obter o sistema misto com as características desejadas para uma futura análise *in vitro* foram realizadas diferentes abordagens metodológicas, tanto na obtenção da macro-estrutura quanto da nanoestrutura e suas associações ao fármaco escolhido.

Em detrimento a não estabilidade das microesferas nas preparações 1, 3 e 4, os parâmetros físico-químicos não foram analisados tais como: a fração da água retida (Wf), percentual de hidratação (%DS), inchaço (DSW) e Difusão (Dm). No entanto, para a preparação 02 os ensaios anteriormente citados foram determinados e após a análise destes parâmetros foi selecionada a formulação para os ensaios de caracterização de morfologia e posterior associação aos sistemas 4 e 6.

3.8.1 Análise morfológica através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Microesfera bead dos sistemas 7-10

Para realizar o ensaio das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), cerca de 5,0 (cinco) mg de microesferas desidratadas foram transferidas para o interior de um dessecador a temperatura ambiente e pressão reduzida por 24 horas. Optou-se por não realizar qualquer tipo de fixação química adicional. Após a desidratação, a lâmina foi fixada com fita adesiva condutora dupla-face sobre o suporte de cobre (estube). Devido à baixa condutividade elétrica da matriz polimérica, uma fina camada de ouro foi depositada revestindo as amostras por meio de um processo de metalização em atmosfera de argônio e paládio.

Esse procedimento foi realizado utilizando um equipamento da marca Balzers®, modelo SCD-050. As amostras foram examinadas e fotografadas nos aumentos entre 250 a 30.000 vezes, operado em tensão de aceleração de 20,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários. No sistema FEI QUANTA 250 foram utilizados entre 250 a 30.000 vezes, operado em tensão de aceleração de 20,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários. Para aquisição das imagens dos sistemas 7,8, 9 e 10 utilizou-se dois detectores distintos o EBSD (Electron BackScatter Diffraction) ou difração de elétrons retroespalhados e o ETD (Everhart-Thornley Detector). As aquisições foram feitas em ambos os detectores e as configurações foram ajustadas no equipamento. Informações com relação ao tamanho puderam ser extraídas das imagens obtidas através do tratamento delas com o software ImageJ®, versão 1.48r, fornecido gratuitamente pelo National Institutes of Health (NIH). Usando a escala fornecida pelo microscópio junto as imagens pode-se estimar a área das partículas em seu estado não-solvatado (porém, metalizado) e obter uma média da distribuição de seu tamanho.

3.9 Caracterização físico-químicas das microesferas (bead) poliméricas produzidas

Parâmetros físico-químicos como: a fração da água retida (Wf), percentual de hidratação (DS%), inchaço (DSW) e Difusão (Dm) foram medidos e analisados para preparação 2. As análises foram serão executadas baseando-se na variação de massa ocorrida durante o intumescimento microesfera (bead) poliméricas, as quais eram aferidas em balança analítica. Após a coleta de todos os valores os mesmos eram plotados em planilha do Excel[®] aplicadas as respectivas equações matemáticas de cada parâmetro físico-químico, sendo:

$$Wf = \frac{(m-m^*)}{1} \quad eq. 01 \quad \%DS = Wf \times 100 \quad eq. 02$$

$$H = 100 \times \frac{(m-m^*)}{m^*} \quad eq. 03 \quad Dm = \frac{m}{m^*} \quad eq. 04$$

Fonte: AOUANDA, MUNIZ e MATTOSSO, 2009.

Onde, “m” é a massa do microesfera (bead) poliméricas e outros materiais intumescido e “m*” é a massa do microesfera (bead) polimérica seca formada da preparação 02.

3.9.1 Fração de água retida (*Water fraction*)

Para o ensaio da determinação da fração de água retida (Wf), coletou-se 10% aproximadamente 24 esferas transferiu-se para um béquer para o procedimento de secagem, em uma estufa por 10 minutos a 140°C, pesou-se em balança analítica. Em seguida as amostras eram separadas com auxílio de uma pinça metálica e colocadas em superfície limpa e numeradas de 1 até 24. Utilizou-se um paquímetro digital para mensuração do tamanho das esferas, e em seguida todas foram colocadas na placa de poços de 24 (vinte e quatro) unidades com onde cada poço estava contido de 1 ml de água ultrapura.

3.9.1.2 Difusão, Percentual de Hidratação e Inchaço.

No experimento de quantificação de difusão de água nas esferas utilizou-se o valor obtido da fração de água retida (W_f) como sugerido na equação 02. Em seguida anotou-se os valores obtidos (ver tabela 5). Para determinação do percentual de hidratação das esferas obtidas na preparação 02, foram inseridos os valores das massas das microesferas na equação 03. Em seguida todos os dados foram anotados e tabulados para análise (ver tabela 5) o ensaio de determinação do inchaço das esferas foi calculada com o quociente da relação das massas da preparação após todos os ensaios físico-químicos das microesferas poliméricas.

3.9.1.3 Análise do diâmetro médio e polidispersão por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) AuNPcit (sistema 3).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a determinação do tamanho (diâmetro) e a polidispersão das AuNPcit. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, da UnB, com o equipamento marca JEOL; modelo JEM 1011 operado em 100 kV.

Para a preparação das amostras, foi retirada a alíquota de 4 μL da solução nanopartícula de ouro e citrato a qual foi depositada em telas de cobre cobertas com película de Formvar®, anteriormente, a análise o material foi protegido da luz e posto a temperatura ambiente por 24 horas para evaporação completa do solvente.

3.10. Análise estatísticas e gráficas.

Os dados foram analisados através do programa Prisma 6.0 para Windows. Algumas medidas foram realizadas em triplicata e os dados matemáticos apresentados com média (desvio padrão). Para auxílio ainda na construção de gráficos foi utilizado o Excel®, versão 2013.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.0 Resultados e discussões

4.1 Produção das Microesfera polimérica bead

É bem descrito na literatura científica o processo de formação das microesferas “beads” e este é iniciado quando o de gel de alginato flui por meio de um dispositivo que seja capaz de proporcionar alíquotas a fim de desencadear a reação de polimerização na solução de quitosana. A tensão superficial entre o polímero e água substituem a força de tensão da superfície entre o polímero e o dispositivo de gotejamento, quando a gotícula cai na solução de quitosana, dando por conseguinte, a formação da microesfera formada através de interações hidrofóbicas-hidrofílicas. Como a microesfera passa a interface hidrofóbica-hidrofílico, estas são estabilizadas pela interação com os íons de cálcio bivalentes.

A seguir, são apresentados os resultados obtidos de quatro preparações avaliadas neste trabalho. Na Tabela 2 é apresentada, a composição das soluções poliméricas, a quantidade de microesferas, bem com os tamanhos médios quando intumescidas e secas, obtidos das preparações de 1 a 4. A tabela 3 refere-se a preparação que se mostrou mais eficiente nas propriedades desejadas, com o agente reticulante (CaCl_2) na concentração $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$.

Tabela 2. Avaliação do tamanho de microesferas de quitosano com berberina ($1,2 \text{ mol. L}^{-1}$) em diferentes concentrações de agente reticulante.

Preparação	Solução. 1 Béquer 1	Solução. 2 Béquer 2	Quantidade de microesferas	Tamanho (mm)
1	0,40 mL [BS] 19 mL H₂O 0,36 g alginato	27 mL H ₂ O 1,8 g CaCl ₂ 0,12 g quitosana 0,3 mL HAc	212	Intumescidas 0,94 Secas 0,74
2	0,40 mL [BS] 19 mL H₂O 0,36 g alginato	27 mL H ₂ O 0,9 g CaCl ₂ 0,12 g quitosana 0,3 mL HAc	198	Intumescidas 0,84 Secas 0,64
3	0,40 mL [BS] 19 mL H₂O 0,36 g alginato	27 mL H ₂ O 0,45 g CaCl ₂ 0,12g quitosana 0,3 mL HAc	210	Intumescidas 0,90 Secas 0,68
4	0,40 mL [BS] 19 mL H₂O	27 mL H ₂ O 0,22 g CaCl ₂		Intumescidas 1,46

	0,36g alginato	0,12 g quitosana	214	secas
		0,30 mL HAc		0,92

Tabela 3. Preparação, soluções, diâmetro médio e quantidade de microesferas produzidas

Preparação	Solução II	Solução I	Diâmetro médio(mm)	Quantidade
2	0,4 mL a 1,2 mmol/l BS. -19 mL H ₂ O - 0,36 g ALG	- 27 mL H ₂ O - 0,90 g CaCl ₂ -0,12 g QS - 0,30 mL HAc	Esferas secas 0,64 ±0,11 Esferas intumescida s 0,84± 0,12	198

A alteração proposta a partir da concentração do agente reticulante, possibilitou estabilidade quanto ao tamanho, entumescimento e morfologia que após a secagem foram avaliados. A partir da apreciação de parâmetros físico químicos e de características das beads obtidas após o preparo, se elegeu a preparação 2 da tabela acima como ideal para a combinação com as AuNPs. Uma vez que a produção realizada nessa preparação possibilitou microesferas

de formato regular e tamanho em escala nano, com baixa porosidade e agregação. Após o procedimento de secagem a temperatura ambiente as microesferas formadas nas preparações 3 e 4, ainda se apresentavam turgidas com água e mesmo após o tempo de 24 horas de secagem, não foi possível obtê-las secas.

Ao contrário do que ocorreu nas preparações 1 e 2 que após 12 h já se encontravam secas com a aparência cristalina (figura 12 a) secas). As microesferas formadas na preparação 1 foram medidas com o paquímetro universal e os valores estão listados na tabela 02 e em função do tamanho se aproximar de 1 mm, quando intumescidas optou-se nesse trabalho por um menor diâmetro que foi obtido na preparação 02.

Tabela 4. Diâmetro médio das microesferas da preparação 02, secas e entumescidas.

Secas (mm)	Entumescidas (mm)
0,66±0,09	0,85 ±0,10

A teoria do entumescimento foi desenvolvida por Flory e Rehner e colaboradores em 1943, e consideraram que o fenômeno de entumescimento é regido basicamente por três parâmetros: i) a variação pela relação solvente-polímero; ii) a variação conformacional causada pela redução no número de conformações das cadeias, em consequência de seu estiramento e iii) a entalpia de mistura do solvente e polímero (FLORY, 1943). Assim, o intumescimento de um dado polímero é dependente do grau de interação entre as moléculas de solvente e do polímero, que pode ser relacionado com o parâmetro de interação solvente/polímero em função da massa da matriz polimérica. Em relação aos parâmetros de fração de água retidas, percentual de hidratação, inchaço e difusão estes foram analisados para 24 beads, calculou-se a média e os valores seguem apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos das amostras microesferas beads na preparação 2 (fração da água retida (wf), percentual de hidratação (%Ds), inchaço (%Dsw) e Difusão (Dm).

Wf	%Ds	Dsw	Dm
0,25±0,05	30,15±10,60%	24,55±5,30%	1,25±0,05

A difusão (Dm) é dependente da quantidade e ainda composição química da matriz polimérica, como quitosana e alginato apresentam relaxamento de cadeia quando em meio aquoso, a força mecânica das paredes nas beads diminuem, fato que também tem decorre da hidrofiliçidade da rede polimérica, permitindo rompimento e permeabilidade de fluidos polares. Dessa forma é posto concluir que ocorreu absorção de água, com aumento médio de volume total da microesfera entumescida de 1,25 vezes em relação a microesfera seca.

A fração de água retida (Wf) tem relação com a porosidade das microesferas. A reação de formação dessas estruturas é estabelecida quando o gel de alginato interage com a solução de quitosana e agente reticualnte (CaCl₂). Nessas condições e sob agitação a microesfera é formada por enovelamento e interações covalentes dos polímeros em meio aquoso, acredita-se que pela agitação e quantidade dos reagentes utilizados existam regiões com diferentes quantidades de matéria, possibilitando a formação de espaços que não puderam ser preenchidos durante a agitação da solução (RODRIGUES, 2012). Na análise o valor médio de retenção de água nas beads avaliadas foi de 25,0 %.

O inchaço (% Dsw) e percentual de hidratação (%Ds) estão associados ao efetivo aumento da microesfera com seu aumento de volume. A força mecânica da rede polimérica é influenciada pela natureza dos polímeros, como alginato e quitosana que apresentam elasticidade elevada quando combinados por cadeias carbônicas (líquidos podem penetrar a microesfera por regiões oriundas da difusão aumentando o volume total da microesfera). Esse

fato é decorrente da reação de polimerização interfacial que permite a formação de regiões com monômeros aniônicos, ainda durante a síntese, que não formaram a rede polimérica (FENG, 2007). A partir das medições feitas com auxílio da equação 03 do item 3.7, obteve-se valor médio de 25,55 que permite inferir que as beads podem intusmecer e 30,15% para retenção de líquido.

4.1.2 Sistema Misto: Microesfera de quitosana/alginato contendo Berberina e nanopartículas de ouro associadas a Doxorrubicina.

No desenvolvimento deste trabalho foi utilizado duas abordagens na construção do sistema misto constituído de microesfera de alginato revestida de berberina carregada com berberina e posteriormente associada a sistema nanoestruturado de ouro. No sistema de nanopartículas de ouro foi associada doxorrubicina com citrato e THPAL. Na Figura 10, a seguir, é apresentado os dois modelos produzidos neste trabalho.

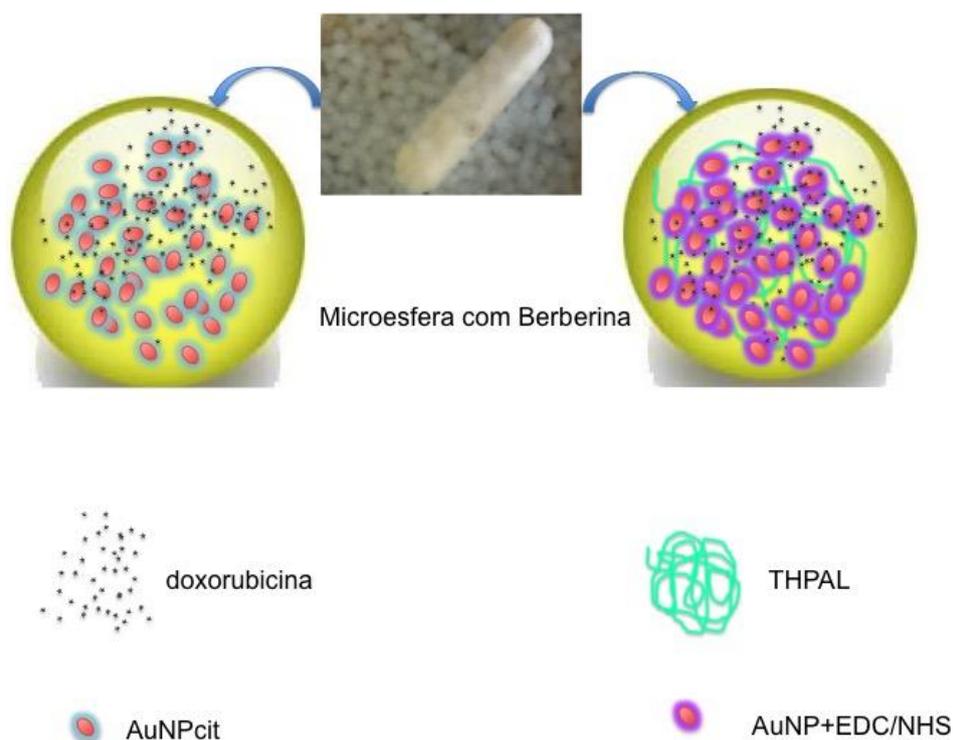


Figura 10: Esquema de microsferas com nanopartículas de ouro associada a doxorubicina em citrato e com acoplamento a THPAL.

4.2 Caracterização do sistemas 1-10

4.2.1-ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA UV-VIS E FTIR

A caracterização por espectrofotometria dos sistemas 1-6 foram avaliados na região UV-visível pela varredura espectrofotométrica de 800 nm a 200 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

Na Figura 14 é apresentado o espectro de absorvância normalizado dos dois fármacos estudados; a berberina (sistema 1) e a doxorubicina (sistema 2).

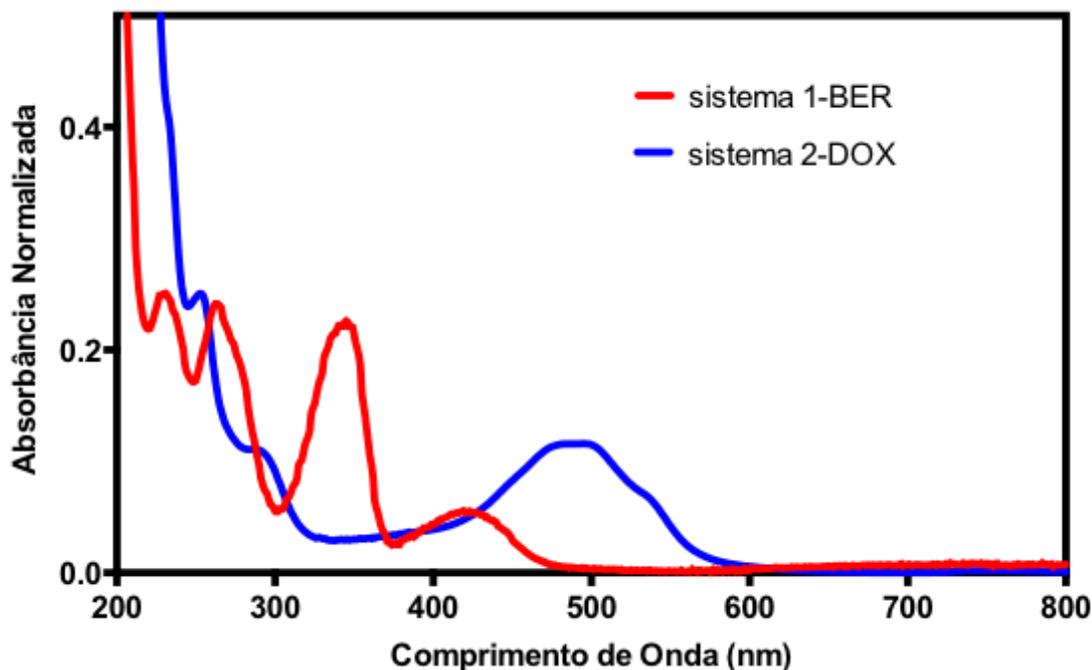


Figura 14: Espectro de absorção normalizado do sistema 1 e 2 em água ultra pura.

No espectro de absorção figura 14 é possível destacar o pico para berberina na região de 344 nm e a doxorrubicina 512 nm valores amplamente verificados por referências bibliográficas. A figura 15 mostra a varredura espectrofotométrica gerada para o volume de 3,0 mL de suspensão coloidal das AuNPs (sistema 3 e 4) e o espectro da DOX, onde ocorre a banda de absorção na região de 520 nm, sendo que nesse valor as AuNPs tem expresso o fenômeno de absorção de plasmônico.

Na figura 15 são apresentado os espectros de absorção da DOX em solução e associado as nanopartículas de ouro. Observa-se um alargamento da banda de plasmon sendo que nesse faixa de absorção, possui dependência em sua frequência que sofre interferências, pelo tamanho e forma e das propriedades dielétricas do meio, mas ainda do substrato que recobre as AuNPs (PAVERTHY, 2012).

Na literatura os espectros e valores de absorção das nanopartículas de ouro já foram bem definidos com diâmetros médios iguais a 9, 15, 22, 48 e 99 nm com máximos de absorção

em 517, 520, 521, 533 e 575 nm, respectivamente, em meio aquoso. (YAKAMURA et al., 2005). A síntese e a estabilização de AuNPs, por redução química, se estabelece na presença do íon citrato (FRENS, 1973) e ainda pela interação dos materiais: ácido áurico e água. Em 1951 Turkevich, descreveu essa metodologia que mais tarde foi pesquisada por Frens que descreveu o mecanismo de variação de tamanho, ocasionado pela redução do citrato, em AuNPs. Para Frens e colaboradores, a síntese ocorre, primeiro, por nucleação rápida, e depois por crescimento difusional controlado. A reação química se processa basicamente, com a mistura do sal de ouro com o citrato em água fervente, após formada as AuNPs obtém-se um fluido líquido estável de cor vermelha. Nesse processo, químico, o íon citrato apresenta duas funções distintas e complementares, ora agente redutor ora agente estabilizante. (TURKEVICH et al., 1951)

Na Figura 16 é apresentado o espectro de absorção do sistema 5 e 6 cuja a interação do fármaco DOX ocorre de maneira covalente através de acoplamento EDC/NHS na superfície da nanopartícula de ouro.

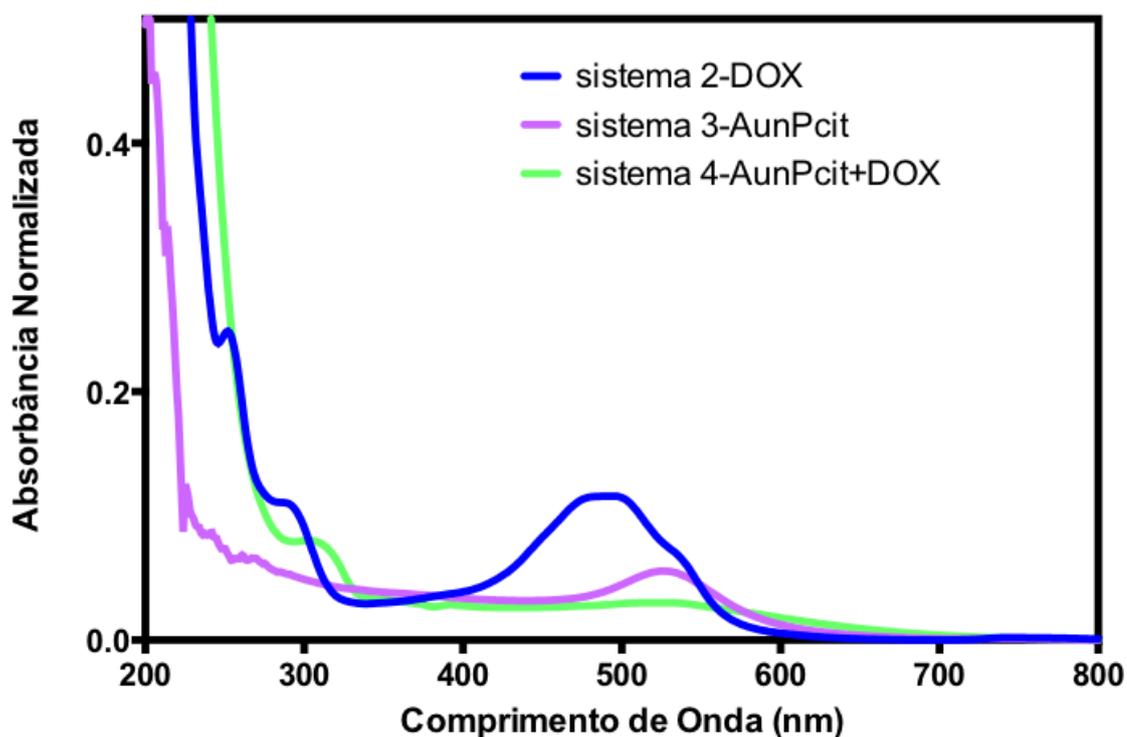


Figura 15: Espectro de absorção normalizado dos sistemas 2,3 e 4 em água ultra pura.

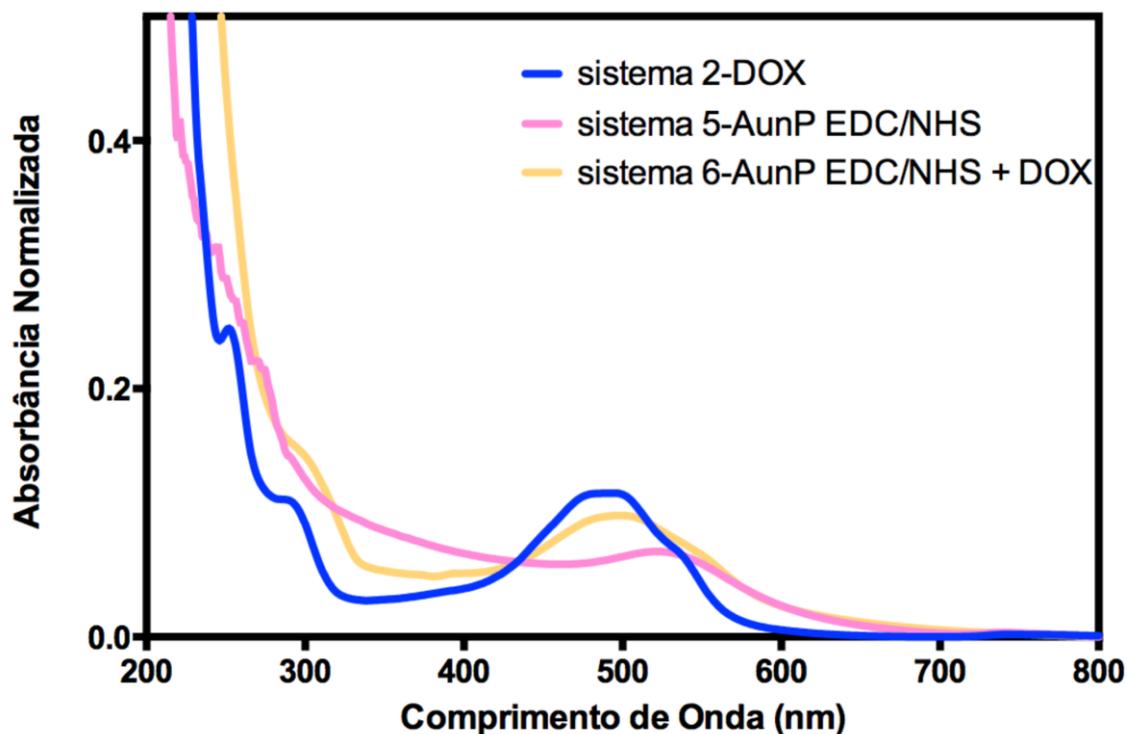


Figura 16: Espectro de absorção normalizado do sistema 2,5 e 6 em água ultra pura.

A estabilização dos sistemas 5 e 6, ocorreu com o ouro por ligações covalentes, em síntese química cujo o acoplamento foi realizado com o auxílio de radicais orgânicos com grupos carboxila e amina. Assim, nesse trabalho, visando uma maior estabilidade do revestimento se optou utilizar de ligações covalentes para acoplamento a partir dos ligantes químicos EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil carbodiimida) e NHS (N-hidroxissuccinimida) que possibilitaram o acoplamento da DOX na superfície da AuNPs obtidas no sistema 03. A eficiência de EDC para conjugação é geralmente dependente da faixa de pH, da temperatura e das interações químicas durante o acoplamento covalente.

Os ligantes químicos citados anteriormente, a partir de interações com os grupos carboxila aderidos a superfície das partículas, possibilitam a formação de complexos ou grupos químicos intermediários, que tendem a reagir com aminas primárias. Esse processo tem de alta ocorrência em proteínas/enzimas específicas dos organismos. (WU H et al., 2013).

Os espectros de FTIR foram obtidos com absorção na região de 400 - 4000 cm^{-1} à temperatura ambiente a fim de se verificar os principais picos de absorção dos componentes da matriz polimérica e dos fármacos. Foram analisadas amostras do fármaco na forma livre e nos sistemas 7,8, 9 e 10, bem como de toda matriz polimérica (figuras 17). Os principais picos identificados nos espectros das amostras foram listados na tabela 06 juntamente com suas interações, para os gráficos de FTIR se identificou os picos mais relatados na literatura.

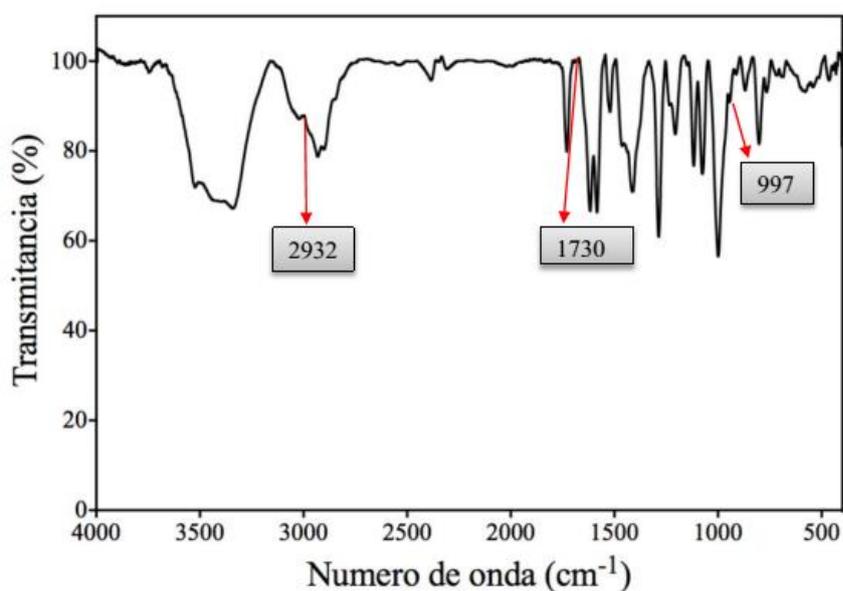


Figura 18. Espectro de FTIR do fármaco DOX na forma livre em pastilha de KBr.

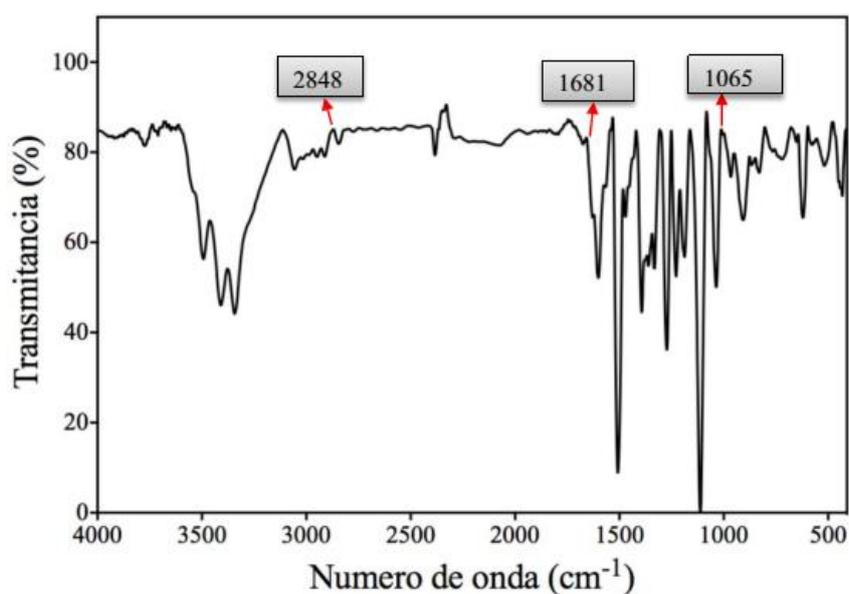


Figura 17. Espectro de FTIR do fármaco BS na forma livre em pastilha de KBr.

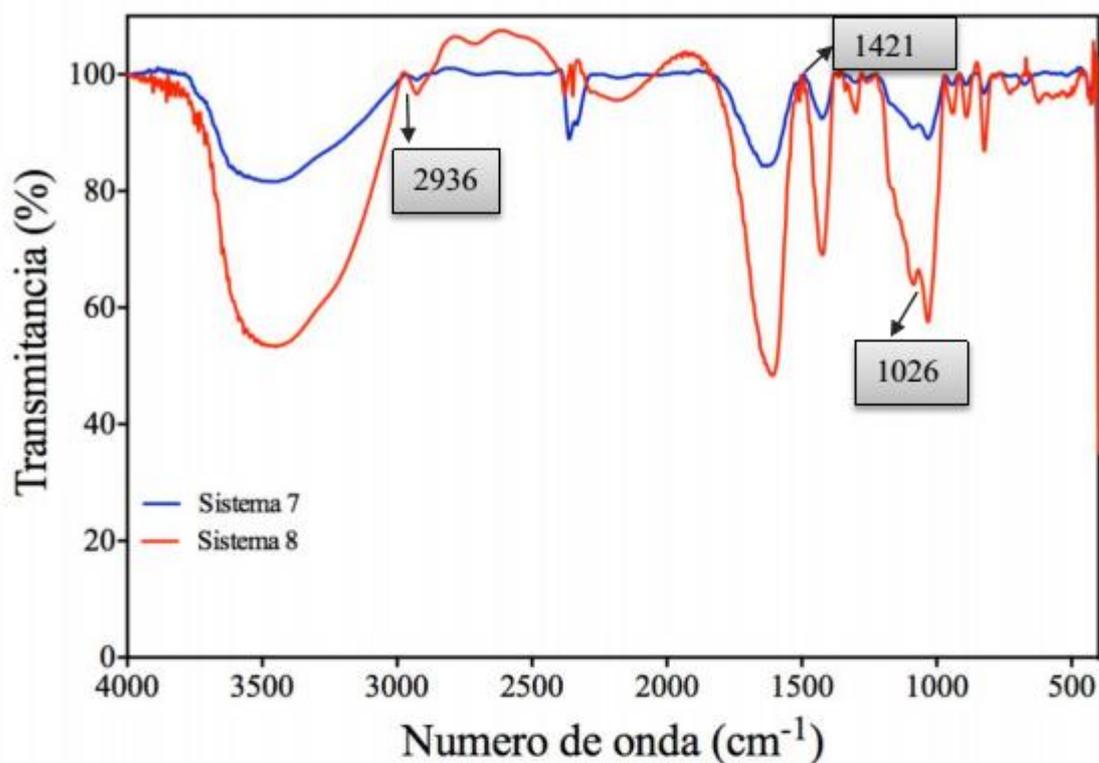


Figura 19. Espectros de FTIR dos sistemas 7 e 8 sobrepostos em pastilhas de KBr.

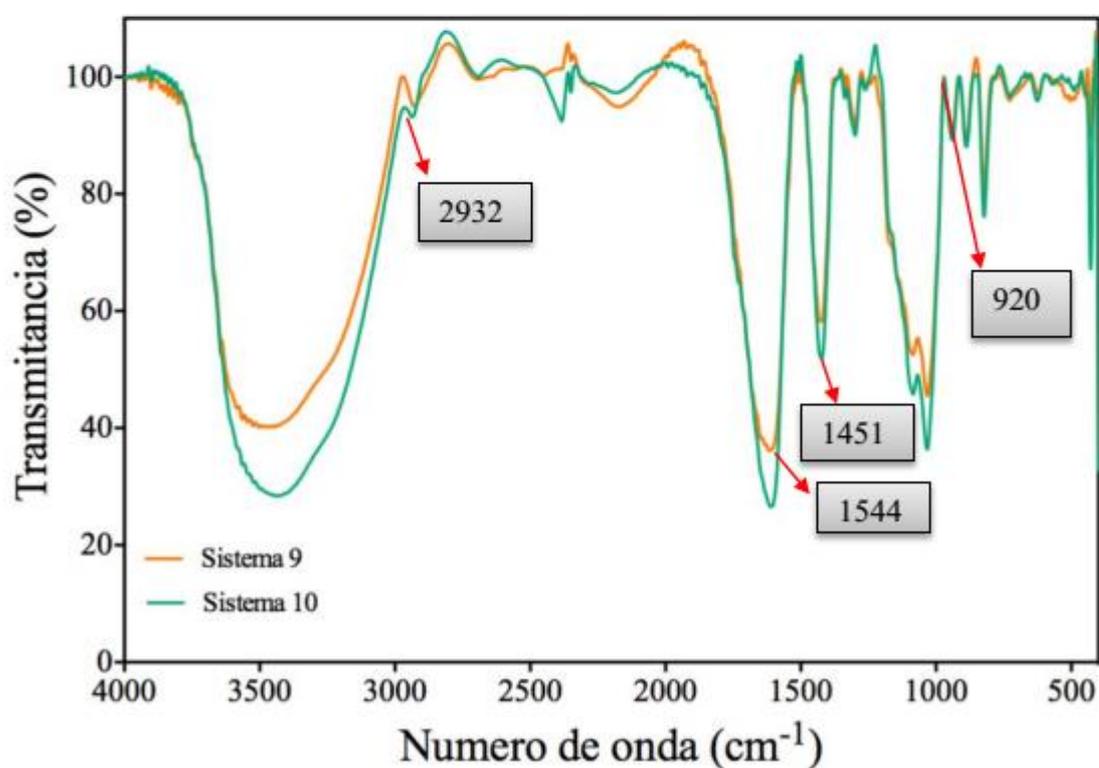


Figura 20. Espectros de FTIR dos sistemas 9 e 10 sobrepostos em pastilhas de KBr.

Tabela 6. Bandas de absorção no FTIR, doxorrubicina, berberina, citrato de sódio, alginato de sódio e quitosana.

DOX	3450 ν (N-H); 3330 ν (H-O); 2932 ν (C-H); 1730 ν (C-O); 1618, 1521 δ (N-H); 1410 ν (C-C); 1280, 997 ν (C-O-C); 1070 ν (C-O); 870, 805 ω (N-H)
Berberina	2848 ν (C-H); 1681 ν (C=C, C=N); 1065 ν (C-O)
Citrato	3650; 3436 ν (O-H); 2880 -2945 ν (CH ₂); 1466-1544 ν (C=O); 1300-1070 ν (C-OH); 920; 938; 963 ν (C-C)
Alginato de sódio	3418 ν (O-H); 2936 ν (C-H); 1026 ν (C-O-C)
Quitosana	1595 ν (NH ₂); 1421 ν (COO ⁻) stretch

A quitosana conter ligações químicas características do grupo amino com algumas porções estruturais de acetamida, apresenta bandas características bastante específicas que facilitam sua identificação quando submetida a espectroscopia em infravermelho. A partir da análise dos difratogramas ocorreram picos típicos da quitosana; um que indica deformação angular de CH₂ (tesoura) em 1421cm⁻¹ e outro de deformação axial de amina primária em

1595 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2007). A partir da berberina obteve-se um pico característico de estiramento simétrico C – H no pico 2848 cm^{-1} e na região de 1065 cm^{-1} estiramento C-O cíclico, de acordo pelo descrito por ZOU, et al 2008. A doxorubicina também apresentou picos característicos em 3450 cm^{-1} com estiramento simétrico de N-H, na região 2932 cm^{-1} estiramento simétrico no anel da ligação CH_2 (PAIVA et al. 1996).

Quanto ao sal de alginato ocorreram picos em 1026 cm^{-1} , 3418 cm^{-1} atribuídos ao estiramento C-O-C e ao estiramento do grupamento hidroxila e por interações dipolo-dipolo respectivamente, conforme a valores verificados em estudo de caracterização de alginato feito por QUAN et al. 2013. O sal de citrato após análise dos difratogramas apresentou estiramento simétrico na ligação C=O, em 1544 cm^{-1} pico muito comum para estrutura do sal.

4.3 Análise de tamanho

Para se determinar o tamanho médio das microesferas beads obtidas na preparação 2 utilizou-se a partir da manipulação das imagens obtidas no programa ImageJ® e para se medir o parâmetro de distribuição do tamanho hidrodinâmico da AuNPs utilizou-se o equipamento como descrito no item 3.7 (modo size). Além deste método foi utilizado a microscopia eletrônica de transmissão para avaliar o tamanho das nanopartículas do sistema 3.

✓ SISTEMA 3-6 ATRAVÉS DO RAIO HIDRODINÂMICO

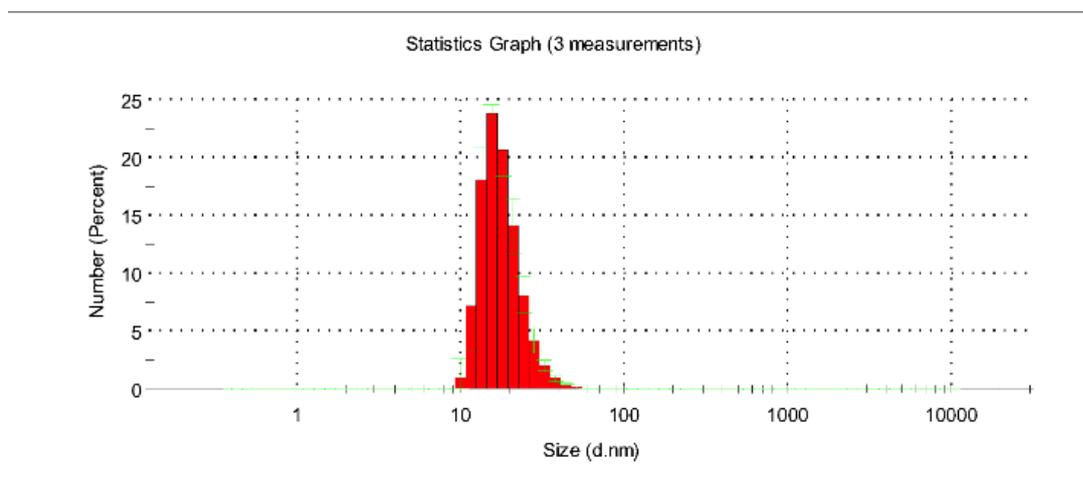


Figura 21: Tamanho de nanopartículas por DLS (Sistema 3).

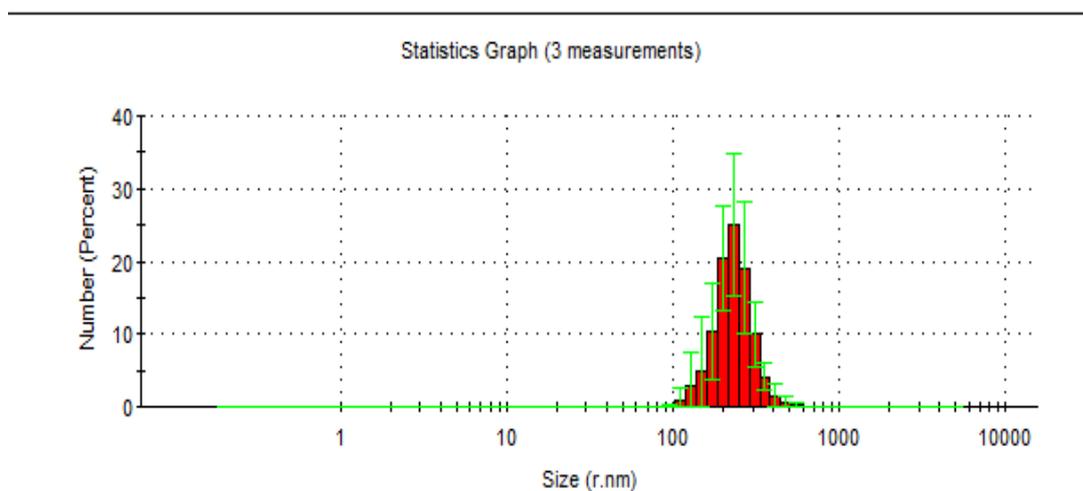


Figura 22: Distribuição de tamanho de AuNPcit+DOX (Sistema 4) aumento da partícula 10x.

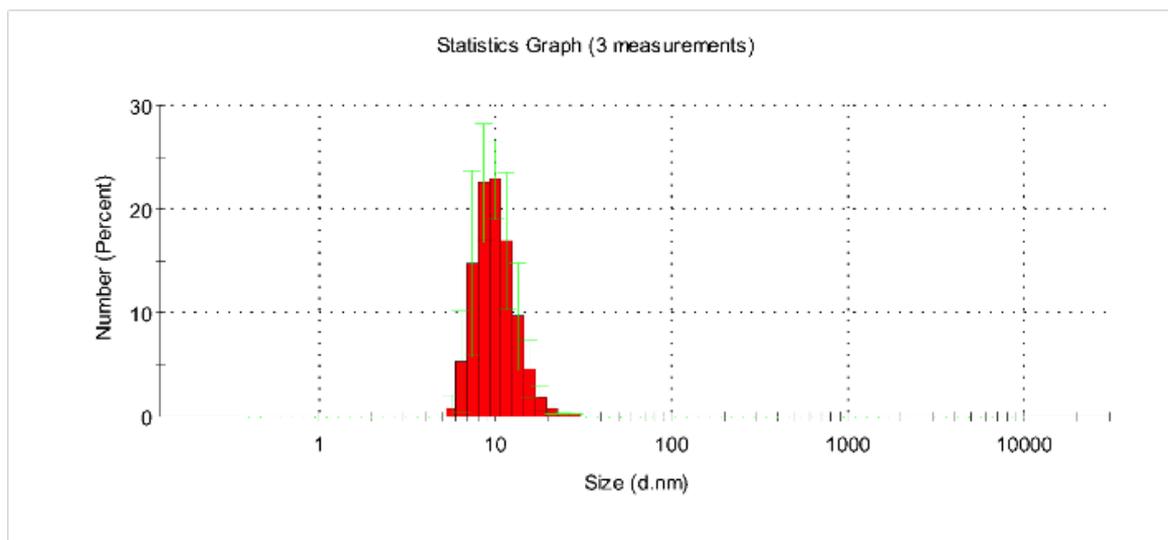


Figura 23: Distribuição de tamanho de AuNP EDC/NHS (Sistema 5).

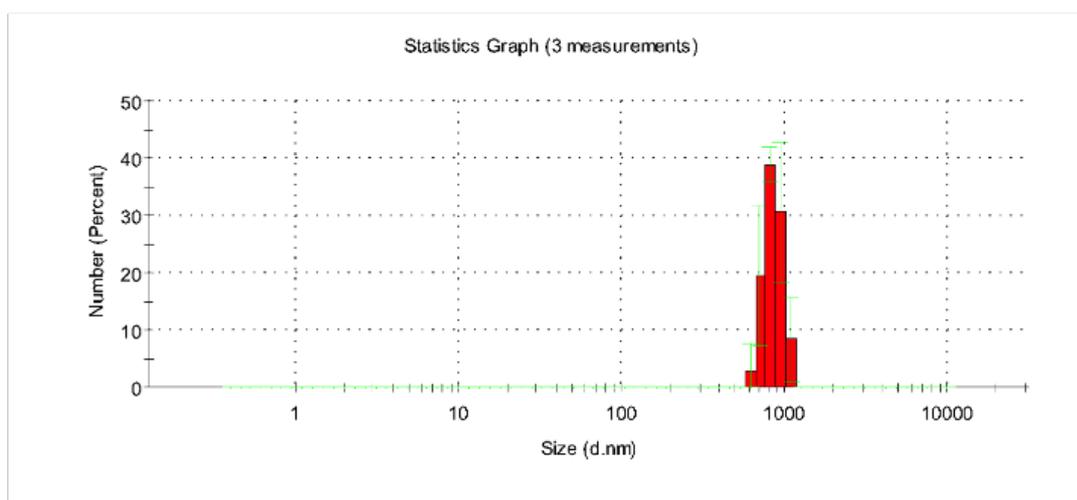


Figura 24: Distribuição de tamanho de AuNP EDC/NHS+DOX (Sistema 6) aumento de 100x.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A microscopia eletrônica de transmissão avaliar a distribuição de tamanhos das AuNPs obtidas no sistema 3. Para aquisição das imagens utilizou-se os seguintes parâmetro, comprimento de onda 100kV, com lentes magnéticas, ângulo de abertura de 30°, aumento de 10000, com contraste em modo espalhamento, as nanopartículas (figura 25) a amostra analisada de 40 μ L, foi retirada da solução estoque (sistema 3) e imergida em grades de cobre sendo colocadas em seguida para secagem a temperatura ambiente por 24h, após esse período procedeu-se com a coleta de imagens que permitiram calcular diâmetro médio de 20 nm para as AuNPs.

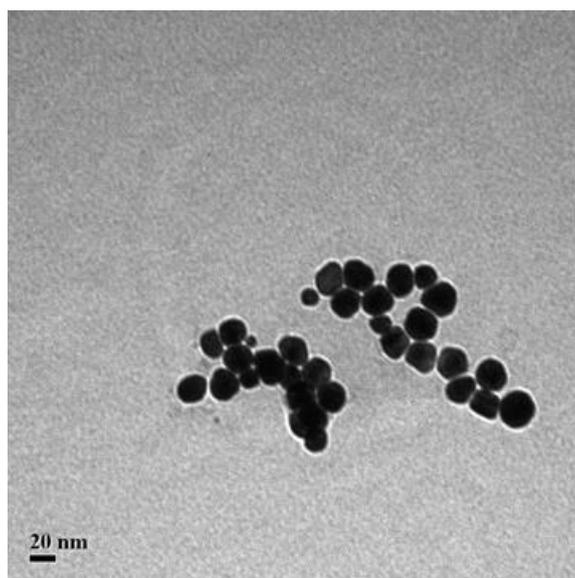


Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão de AuNPcit (sistema 3).

A imagem obtida das AuNPcit apresenta aspecto de forma esférica com regiões mais escuras ao centro, decorrentes da concentração de átomos de ouro nucleados na rede metálica. Na região de aquisição da imagem foram contadas 35 unidades de nanopartículas com diâmetro médio de 20,54 nm, verificado por SPERLING, et al.2008, em estudos de caracterização e aplicações biológicas de nanopartículas de ouro.

4.5 Sistema 7 e 8 tamanhos das microesferas de alginato e quitosana

A análise da imagem (figura 26) foi realizada utilizando o ImageJ no módulo particle analysis (auto threshold) seguido de do módulo measurement (média de pixels). O Histograma obtido mostra distribuição das esferas na dimensão de 120 pixel (escala utilizada sendo 0.138 pixel/nm), sendo o valor máximo de 869 nm de tamanho médio das esferas.

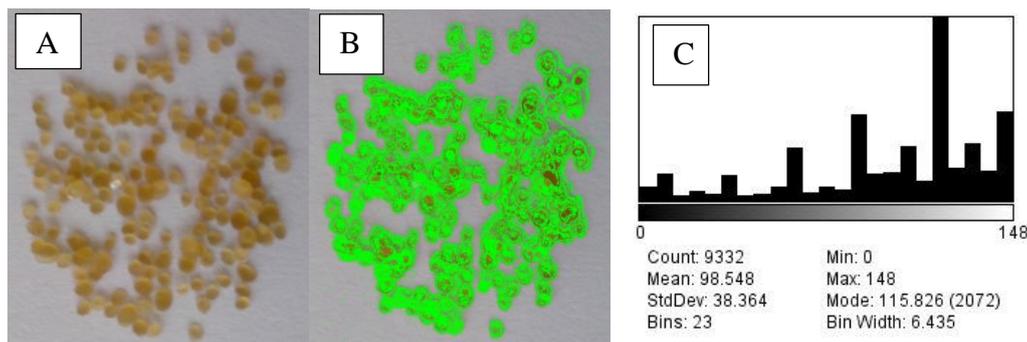


Figura 26: A) foto das microesferas de ALG recoberta com QS contendo BS; B) análise no ImageJ (particle analysis); C) resultado de distribuição de tamanho médio (pixel).

4.6 Sistema 3-6 através do potencial zeta

Os materiais microscópios em contato com líquidos podem adquirir carga elétrica na superfície, ocasionando na formação potenciais elétricos, dependentes da superfície das nanopartículas e da distância entre o líquido e as nanopartículas. O potencial zeta é o potencial elétrico formado entre o plano deslizante e a superfície das nanopartículas, por ser uma técnica utilizada para investigar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais é muito utilizado em nanotecnologia. A medida do potencial zeta é indireta do quão rápido uma carga ou partícula se move em fluido líquido, então ao se identificar a velocidade das nanopartículas, a natureza do campo elétrico aplicado, a viscosidade e a constante dielétrica da amostra pode-se calcular o potencial zeta.

Essa medida é de suma importância, pois permite avaliar, prever e controlar a estabilidade das suspensões nanométricas por meio da avaliação do potencial zeta bem como dos valores de tamanho médio (d.nm) das nanopartículas dos sistemas 3-6 que estão apresentados na Tabela 7. Os potenciais obtidos refletem a carga efetiva nas partículas, que se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e ainda com a estabilidade da suspensão, os valores apresentados na tabela 7 revelam que os sistemas de 3 – 6 são estáveis, a partir da análise das figuras de 21 a 24 a distribuição de tamanho mostra uma base estreita, porém com PDI elevado, fato que pode ter relação com as interações de natureza iônica e covalente no processo de funcionalização das AuNPs.

Tabela 7. Sistema 3-6 medidas de diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta dos Sistema 3 – 6.

Sistema	Diâmetro Médio (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
Sistema 3	35,00	0,348	-19,00
Sistema 4	365,60	0,452	+ 5,42
Sistema 5	34,90	0,907	- 6,65
Sistema 6	826,20	0,392	+ 0,132

Ao ser analisado os parâmetros obtidos tem-se que no Sistema 3 mostra as AuNP recobertas com citrato, o que confere carga negativa a sua superfície (Figura 21). Ao associarmos a DOX a AuNP recobertas com citrato é observado um aumento diâmetro médio das partículas ocasionado provavelmente pela interação eletrostática e intercalamento do

mesmo na superfície da nanopartícula (Figura 22), esta elevada dimensão pode ser atribuída a processos de agregação devido a baixa carga superficial do sistema.

O sistema 5 é constituído de AuNP recoberta com THPAL(Tris (hidroximetil)fosfina)+D/L-alanina) e EDC/NHS, sendo uma superfície preparada para posterior ligação covalente da DOX a superfície da partícula. É observado um aumento do diâmetro médio em relação ao método de preparo por citrato e valor de carga superficial negativo devido aos grupos carboxílicos terminais (Figura 23). Ao ligarmos a DOX a AuNP com superfície de THPAL EDC/NHS observa-se um aumento no tamanho das partículas e maior agregação (Figura 24).

4.7 Sistema 7-10 através das fotos mev

Nesse trabalho utilizou-se para se avaliar a morfologia dos sistemas as técnicas de MEV e MET, pois apresentam relevantes informações inerentes quanto a forma, o tamanho e superfície, as caracterizações topográficas desse trabalho foram realizadas a partir das amostras sistemas de 7 -10. Para o ensaio realizado no MEV, gera-se um feixe de elétrons emitidos na amostra ou um ponto dela, colimado por lentes eletromagnéticas, a interação entre o feixe – amostra fornece elétrons retroespalhados e secundários, que foram coletados por diferentes detectores como citado no item 3.6. Para o ensaio de análise morfológica foram obtidas imagens por meio do MEV como citado o procedimento no item 3.6 (métodos). Nas figuras 26-31 se encontram imagens dos sistemas 7, 9 e 10. O sistema 8 não foi apresentado pois é semelhante ao sistema 7 (sem BS).

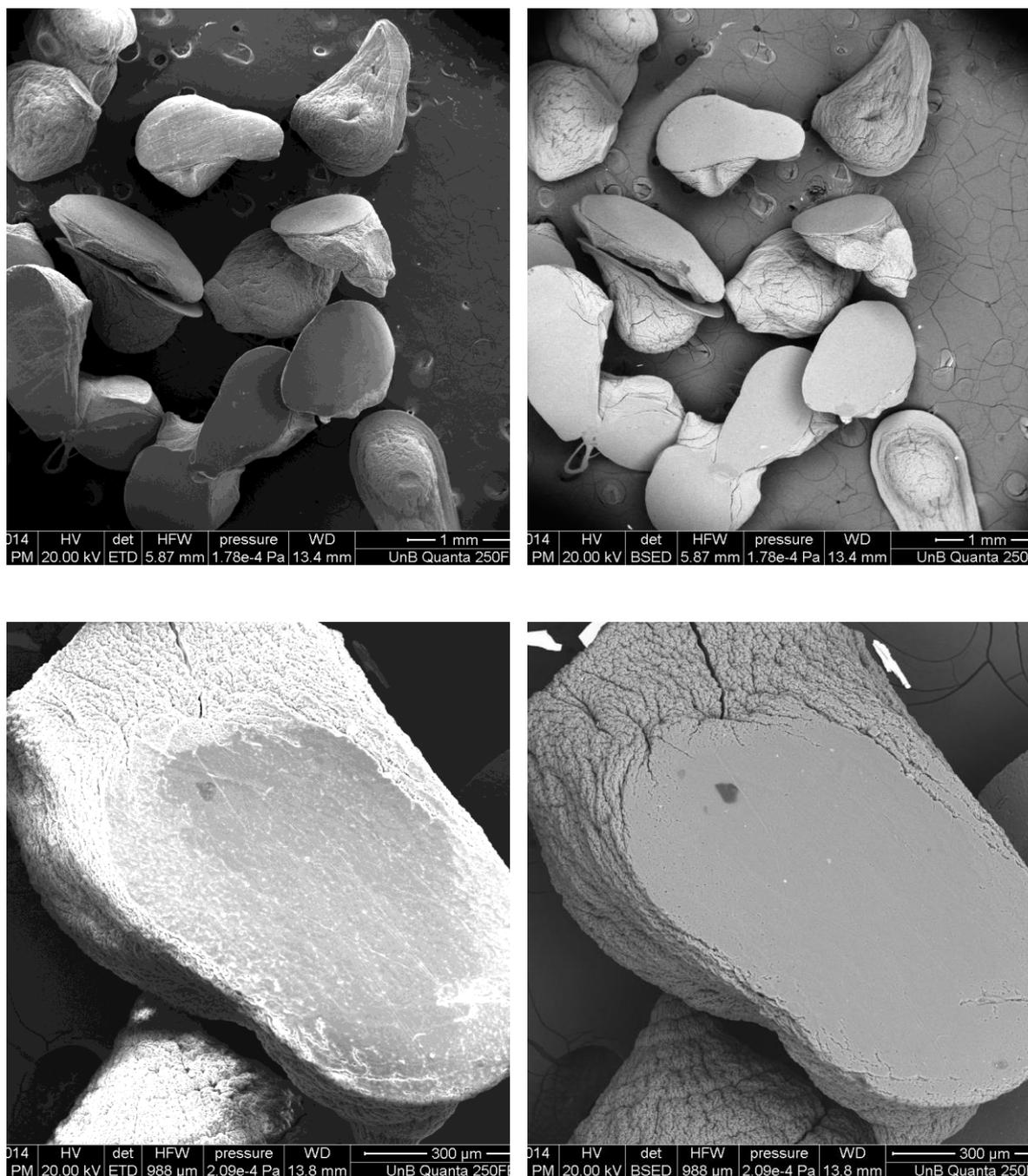


Figura 27: Microesferas beads do sistema 7 secas/vazias analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 154 a 540x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 154 a 540x).

As imagens representadas na figura 27 contém microesferas secas/ vazias que na magnetização aplicada revelaram-se com forma não regular e tamanho médio de 0, 65 mm

em estudo realizado por ACTHE et al, 2000; constatou-se que as microesferas de alginato e quitosana quando formadas por polimerização interfacial a dependem da concentração dos polímeros e apresentam enovelamento de cadeia carbônicas, alterando o formato da rede polimérica. Acredita-se que a concentração de quitosana utilizada afetou a forma e volume das microesferas quando secas, pois as imagens revelam estruturas amorfas e com aspecto não turgido.

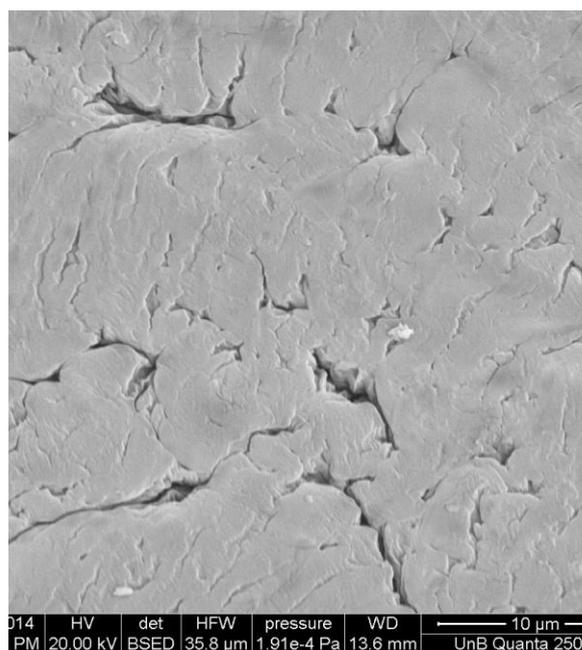
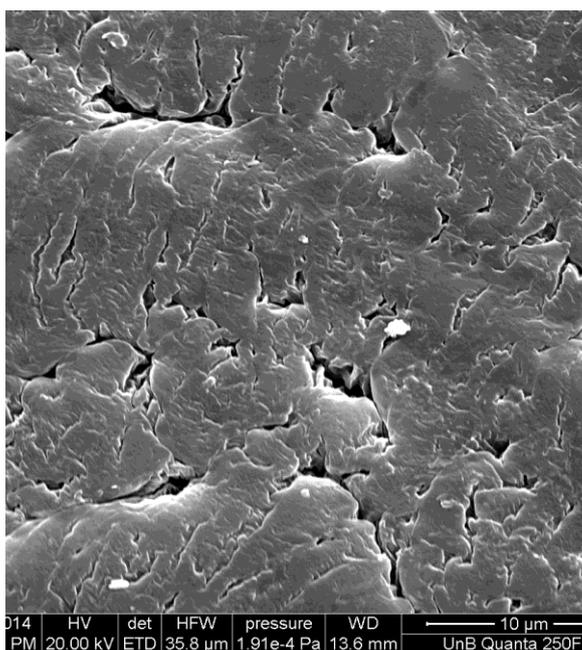
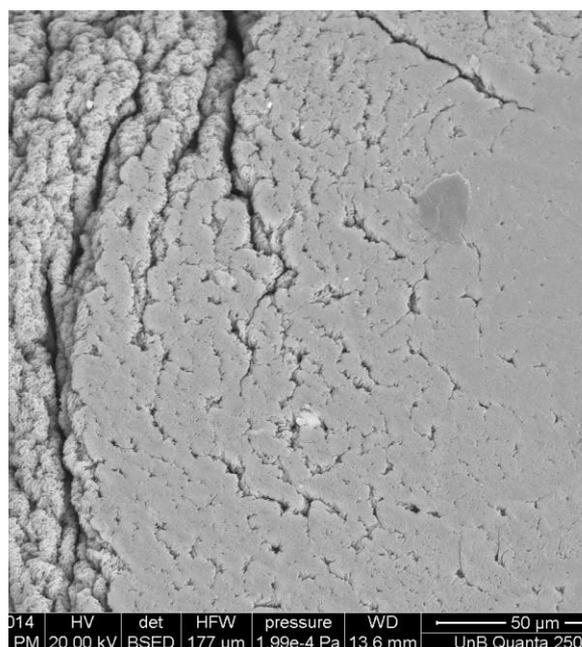
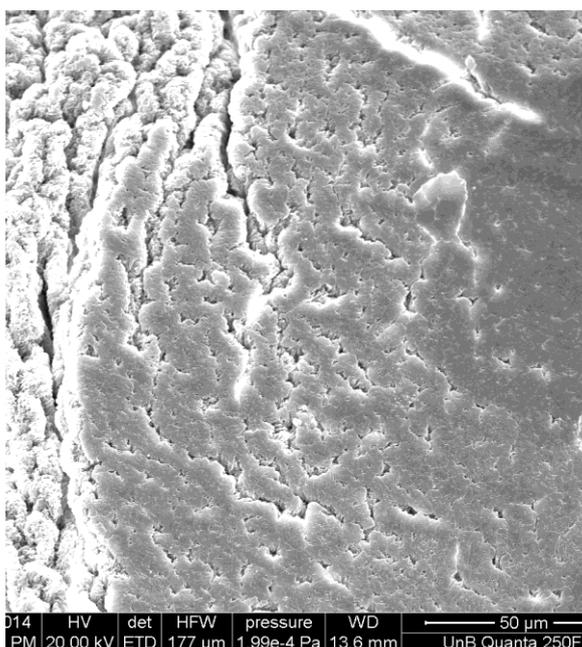
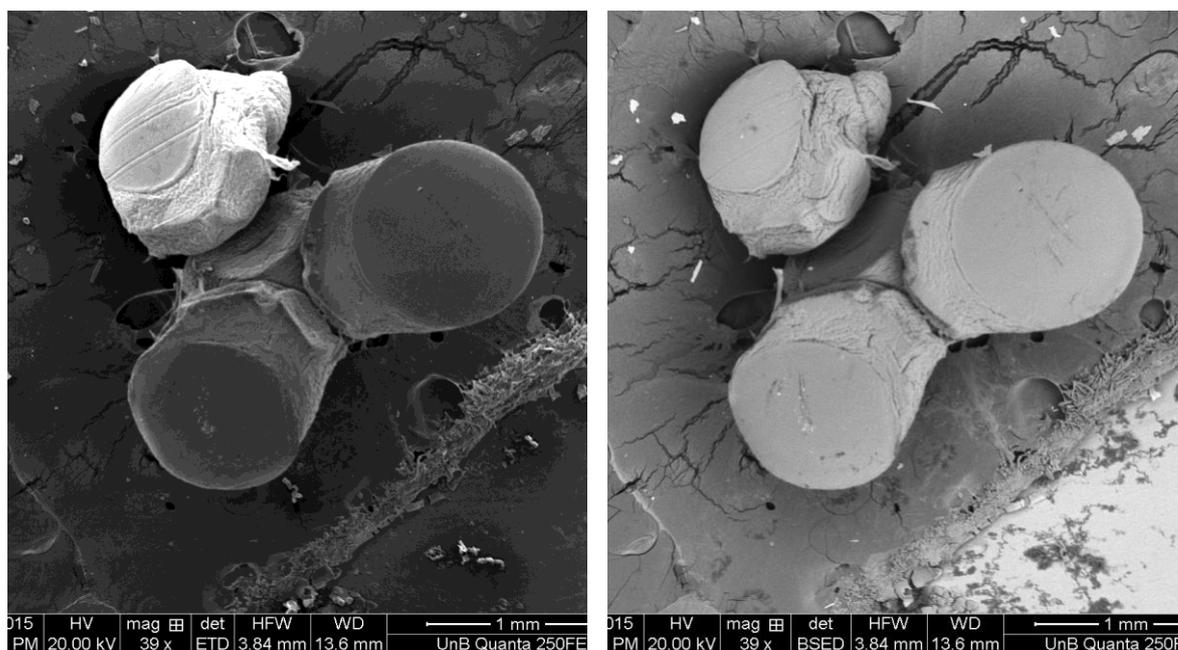


Figura 28 . Microesferas beads do sistema 7 secas/vazias analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 3216 a 16064x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 3216 a 16064x).

Na figura 28 coletou-se a imagem com aproximação suficiente para se visualizar a superfície das beads secas. A respeito de região estudos de caracteriação realizados com esferas de alginato e quitosana por KEOG, et al. 2012, tem-se planos regulares e é possível identificar regiões fissuradas e com presença de materiais poliméricos oriundos da síntese química.



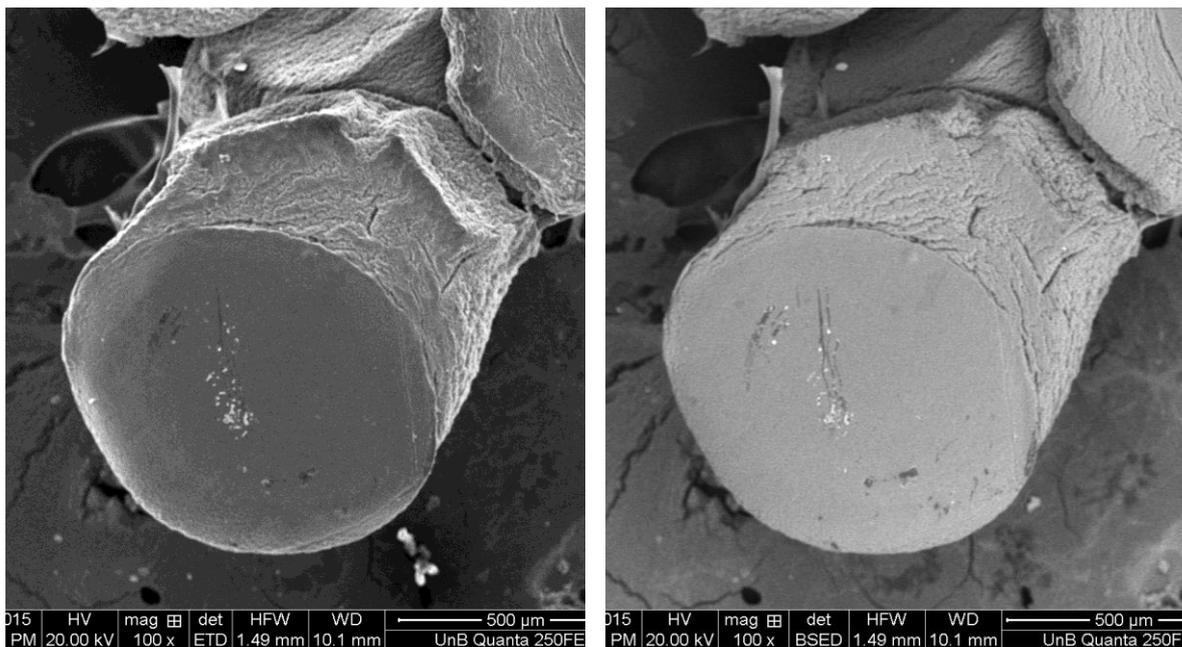
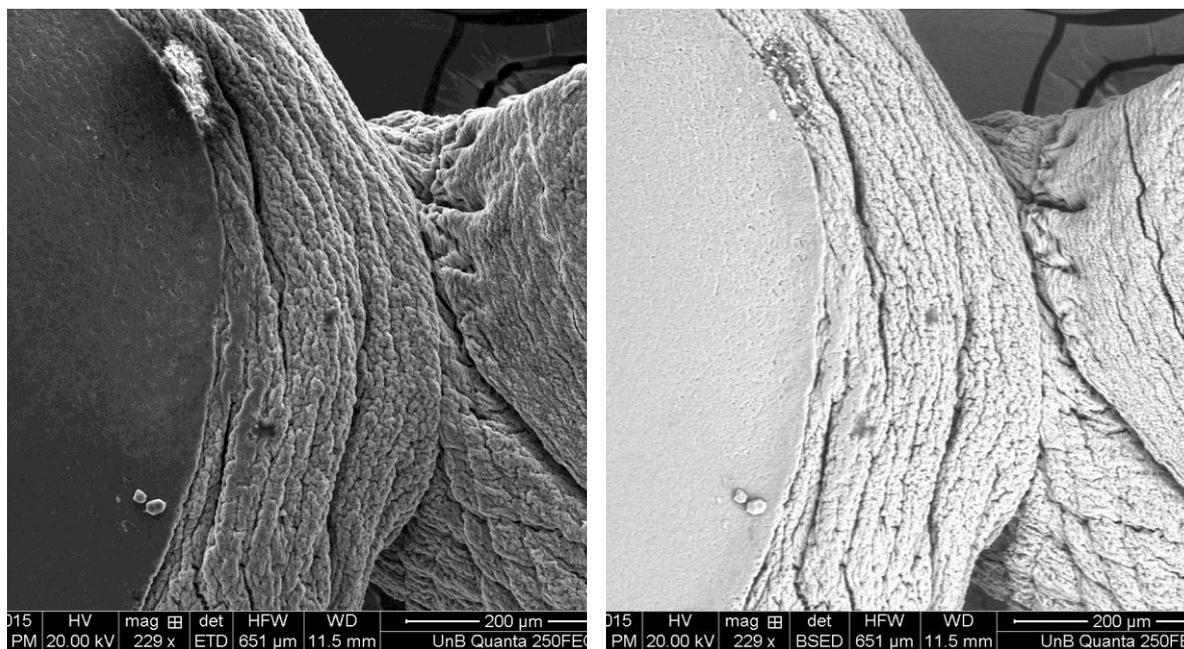


Figura 29: Microesferas beads do sistema 9 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 160 a 327,58x); nas imagens da direita estão a presentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 160 a 327,58x).



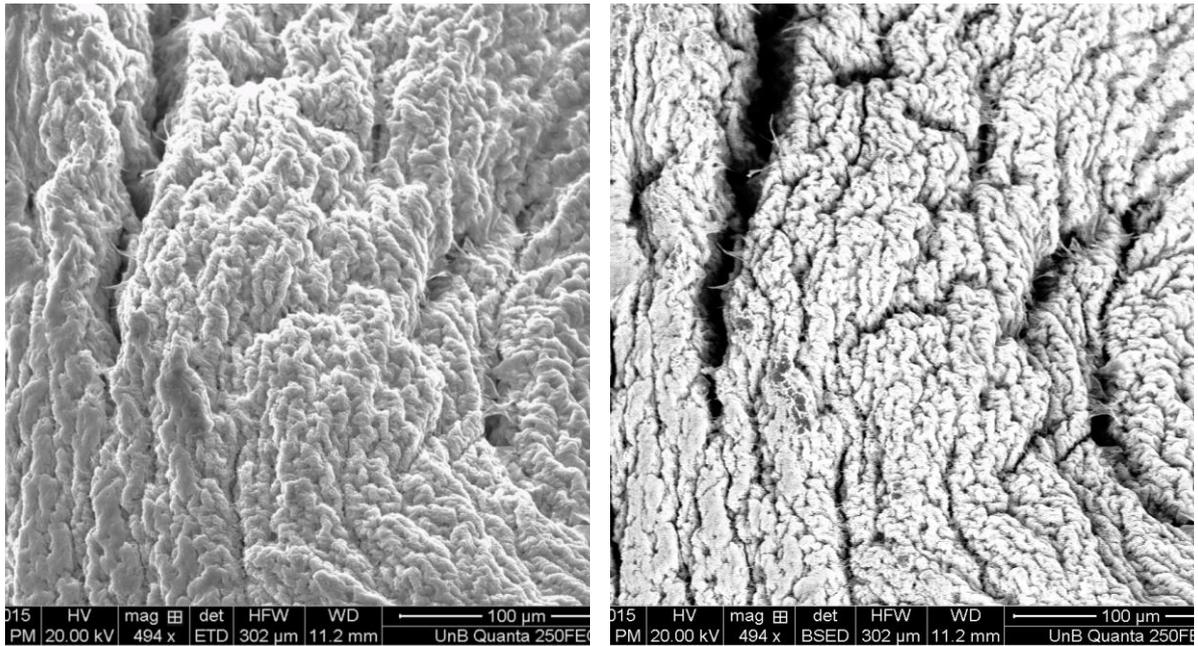


Figura 30: Microesferas beads do sistema 9 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 811,0 a 1635x); nas imagens da direita estão a presentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 811,0 a 1635x).

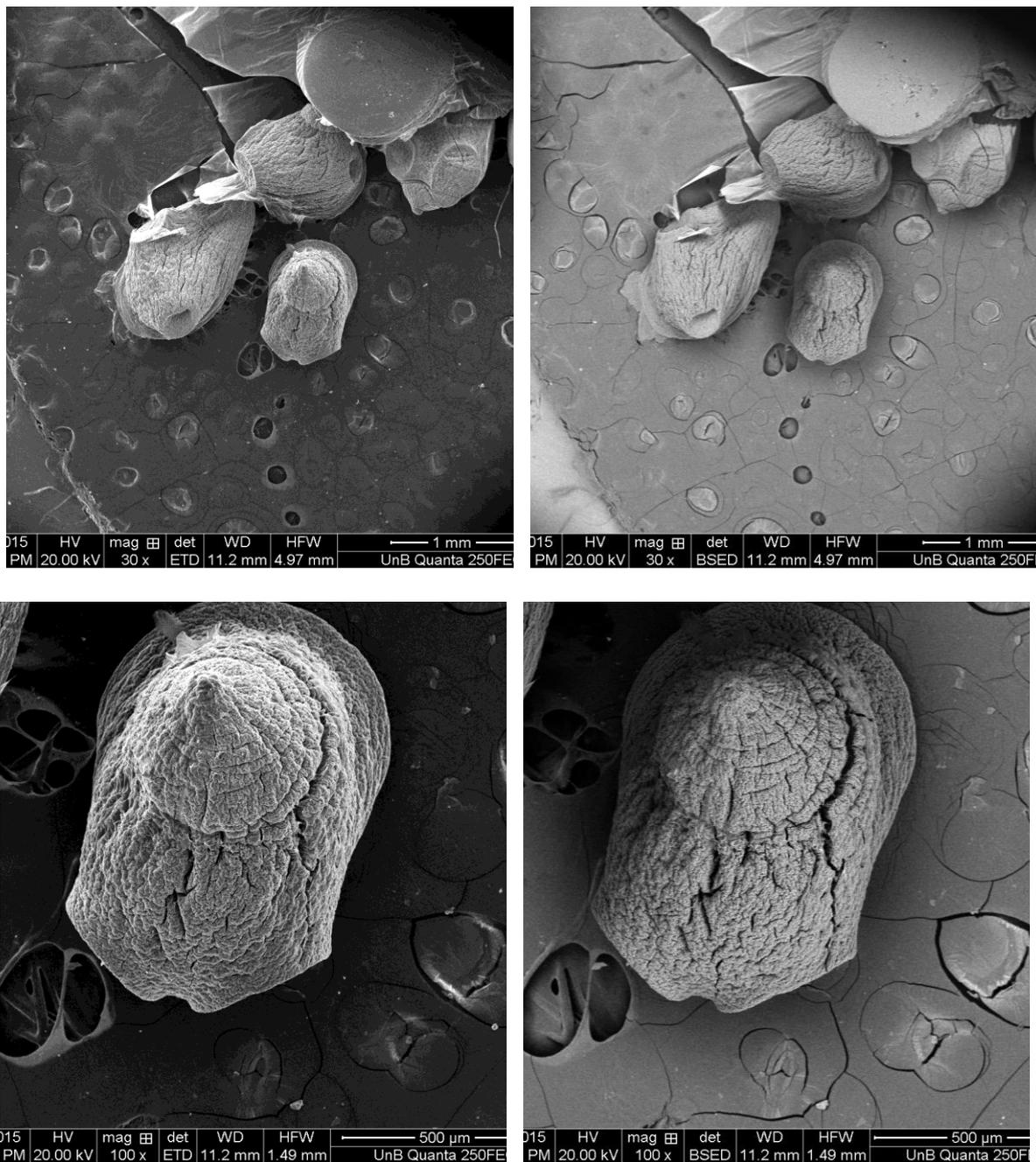
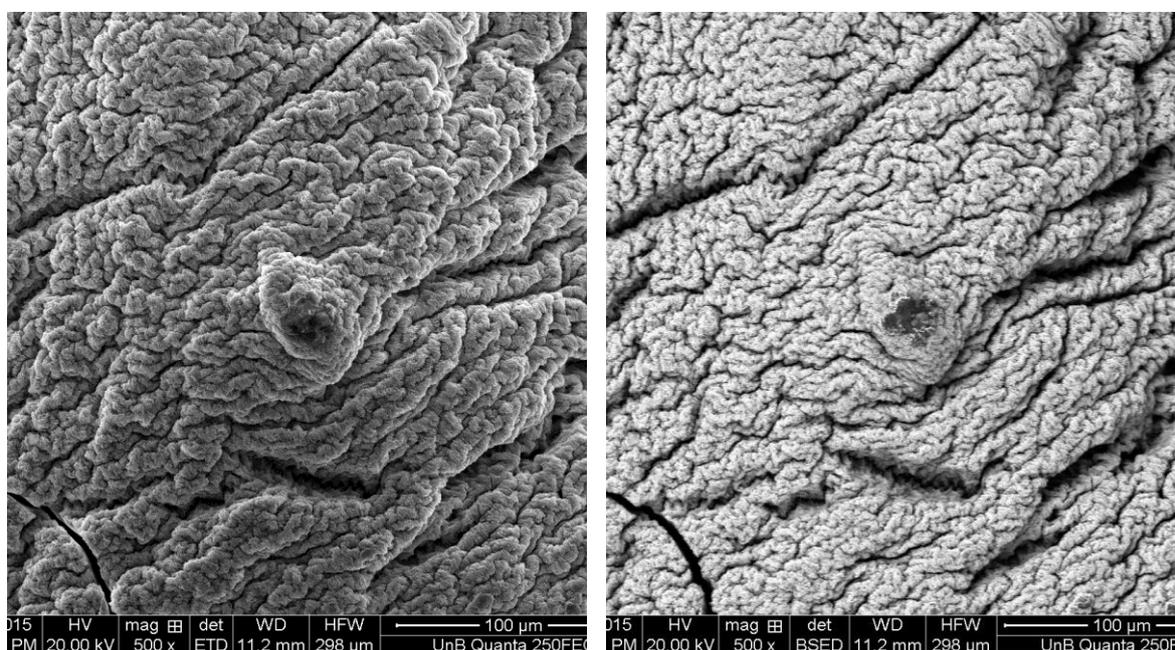


Figura 31: Microesferas beads do sistema 10 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 156,0 a 327x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 156,0 a 327,0x).

As imagens adquiridas do sistema 10 estão apresentadas nas figuras 31 e 32. Nelas ocorrem regiões com fissuras, rede polimérica estável com traços de alta densidade de

materiais poliméricos. Segundo FERRUZZI, et al. 2000 a estabilização de hidrogéis depende das condições de potencial hidrogeniônico e da quantidade do agente reticulante. Nesse trabalho as quantidades utilizadas para confecção das microesferas foram determinadas com relatos da literatura. Durante o intusmecimento das beads do sistema 10, optou-se por inserir as AuNps (edc_nhs) com DOX durante a formação das microesferas ainda em solução. Acredita-se que após a reação química de polimerização os constituintes se depositaram na superfície das beads mantendo o pH da síntese próximo do ponto neutro. Esse fato não resultou em modificações estruturais como representado nas figuras 30 e 32.



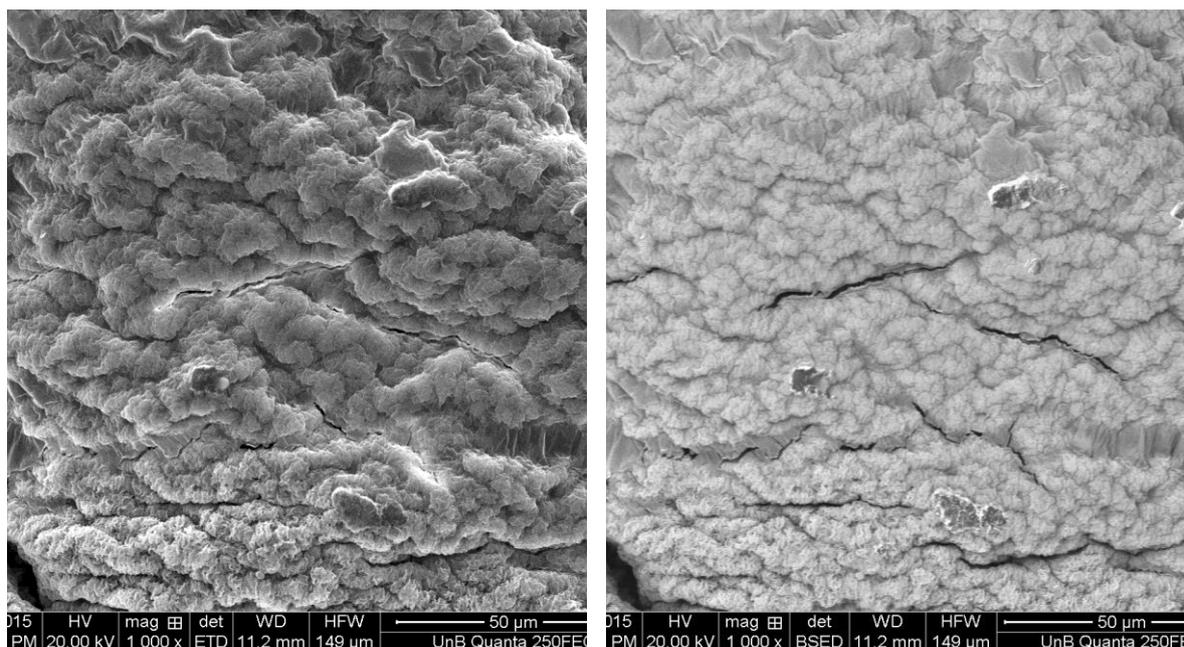


Figura 32: Microesferas beads do sistema 10 analisadas através de MEV, onde os resultados estão na imagem da esquerda as imagens obtidas com o detector ETD (os aumentos variam de 1637 a 3275x); nas imagens da direita estão a apresentadas as imagens obtidas no detector BSED (os aumentos variam de 1637 a 3275x).

Baseado no Efeito Fotoelétrico, descrito por Einstein, Louis de Broglie (1924) imaginou que talvez a matéria, em especial os elétrons, também pudessem apresentar propriedades ondulatórias além das corpusculares. De Broglie propôs as equações: $h=E/v$ e $h=\lambda p$.

Na análise do MEV que consiste em um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente a formação da imagem, a partir de um feixe de elétrons incidente na amostra permitindo o estudo, principalmente, de dois estados de excitação eletrônica: secundários e/ou retroespalhados.

Os elétrons secundários são gerados a partir da colisão entre os elétrons de entrada (descarga elétrica) e os elétrons mais livre da amostra. Assim elétrons de baixa energia com valores entre 10-50 eV, por se encontrem em níveis de energia mais afastados do núcleo, podem ser captados em detectores do tipo Everhart-Thornley Detector (ETD).

Os elétrons retroespalhados, por definição, possuem energia que varia entre 50eV até o valor da energia do elétron primário. O sinal de BSE é resultante das interações ocorridas mais no interior da amostra e proveniente de uma região do volume de interação abrangendo um diâmetro maior do que o diâmetro do feixe primário.

Por meio desses estados e outras interações eletrostáticas com volume da amostra e a carga nuclear efetiva dos átomos que a compõem, é possível nessa microscopia eletrônica, avaliar por detecção dos elétrons referidos, a área superficial de um material.

Nesse trabalho se utilizou dois detectores a fim de comparar imagens da superfície dos sistema 7,9 e 10, para avaliar características topográficas figuras de 27 a 32. Nesse trabalho a opção de utilizar dois detectores possibilitou a captação de imagens com melhores resoluções a fim se de verificar regiões dos sistemas de 7 a 10 que apresentavam deformações estruturais, poros, alterações morfológicas e forma do enovelamento polimérico. Nas imagens coletadas do sistema 7, quase não houweream alterações estruturais que possibilitaram diferenciações quanto a porosidade, porém no detector BSED com o aumento de 540x é visualizado duas regiões distintas, uma com rugosidades e outra com plano mais regular. Em função do processo de gotejamento pela forma da agulha de 0,70 mm utilizada. Na figura 28 ainda pertencentes ao sistema 7 no aumento de 16000x, foi possível constatar regiões com porosidade e rugosidade. Acredita-se que pelo processo de polimerização interfacial entre os polímeros utilizados ocorreram regiões cuja concentração de materiais tenha sido diferentes em decorrência do controle de agitação da solução polimérica final.

As figuras 29, 30 e 31 são referentes as imagens do sistema 9 nos detectores ETD e BSED tem-se microesferas combinadas sem formato regular recobertas com paládio utilizado para metalização. No detector BSED as imagens mostram microesferas com forma irregular e com volumes maiores, fato decorrente da composição química desse sistema que além de polímeros e berberina também contém AuNP e DOX. Na figura 29 tem-se o sistema 09 que contém a matriz polimérica, berberina, Dox e AuNPcit. De acordo com a imagem é possível se verificar que as beads apresentam forma esferoide e são turgidas, semelhante ao que foi estudado por CHATTERJEE, et al, 2005.

4.8 Análise Calorimétrica e Termogravimétrica

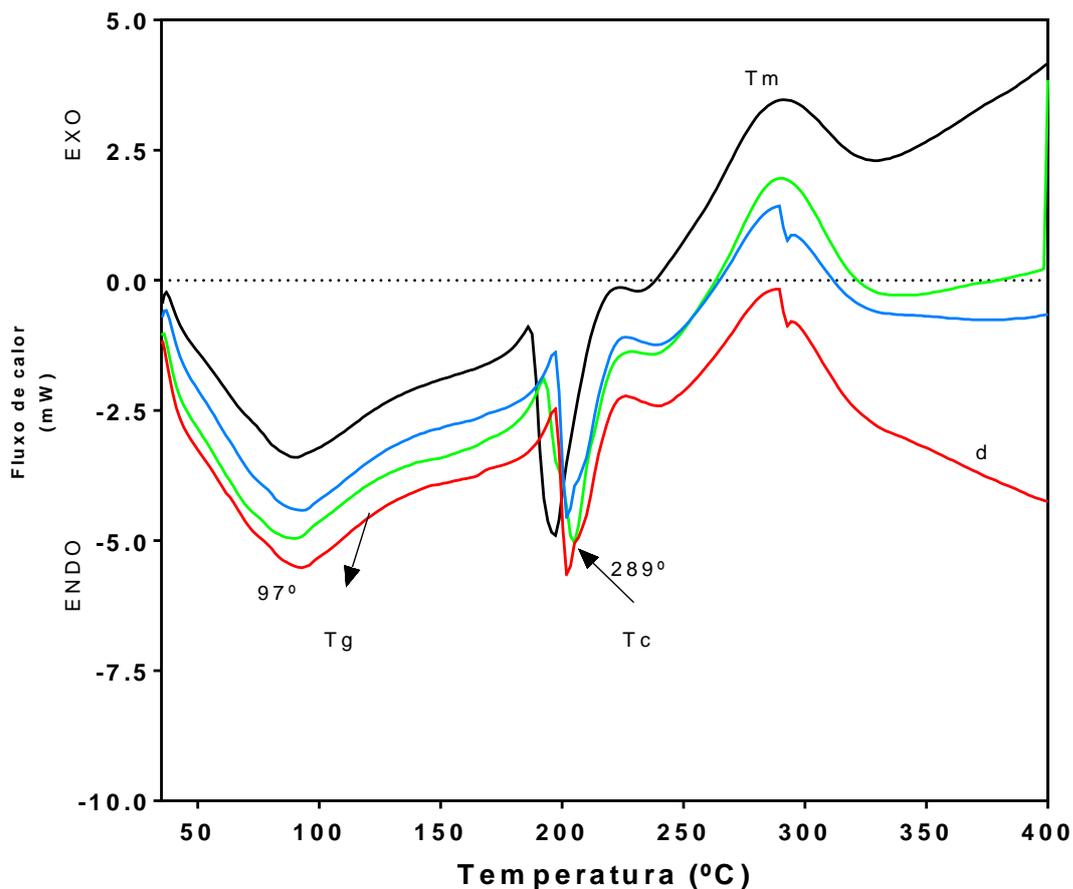
Por meio da técnica de DSC foi possível analisar o fluxo de energia térmica associado nas alterações físico-químicas que podem desencadear variações de calor nos sistema 7-10, tais como: mudanças de agregação (temperatura de fusão e ebulição), e ainda os calores de desidratação, combustão e decomposição. Os eventos endotérmicos (fusão, decomposição, oxidação e ebulição), foram avaliados com TGA.

A técnica de DSC permitiu avaliar as transições que envolviam variações de energia em segunda ordem (entropia) em função da transição vítrea da matriz polimérica. Com o objetivo de avaliar possíveis interações entre o biopolímero quitosana e a berberina e doxorubicina, foram realizadas análises de calorimetria diferencial de varredura (Figura 32).

A curva de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana/alginato (Figura 32-sistema 7) apresenta um pico endotérmico em aproximadamente 97 °C relacionado à umidade presente na amostra e um pico endotérmico em aproximadamente 289 °C. A curva de DSC para o sistema contendo berberina (Figura 32-sistema 8) mostra um pico endotérmico intenso de fusão em aproximadamente 99 °C e e um pico exotérmico em aproximadamente

289 °C referente à degradação do polímero. A amostra das microesferas impregnadas com AuNP associadas a doxorubicina (Figura 32-sistema 9 e 10) apresentaram um pico exotérmico em aproximadamente 297 °C atribuído à fusão das AuNP com os fármacos, mostrando diferença no gradiente de aproximadamente 2 vezes mais de fluxo de calor para o sistema 10.

Os resultados de calorimetria diferencial de varredura para as microesferas de quitosana/alginate impregnadas com o AuNP e doxorubicina/berberina sugerem que ocorre interação física entre a quitosana/alginate e os fármacos, pois não foram observados novos picos de transição e sim o deslocamento dos picos já existentes para temperaturas menores. Os dados de DSC estão de acordo com os dados de TGA indicando menor estabilidade térmica das microesferas sem os fármacos em relação ao polímero do sistema 9 e 10 respectivamente.



Tc=pico de cristalização
 Tg= Transição vítrea
 Tm= Transição de fusão
 d=degradação
 ENDO=Endotermica
 EXO= Exotermica

— Sistema 07 QS +ALG
 — Sistema 08 QS+ALG+BS
 — Sistema 09 CITRATO + DOX+ BS
 — Sistema 10 NHS+DOX+BS

Figura 33: Curva de DSC normalizada (sistema de 7 a 10).

As análises térmicas foram feitas em equipamentos que possibilitaram controlar a variação de temperatura a qual as amostras foram submetidas e com a monitoração quase instantânea das transformações.

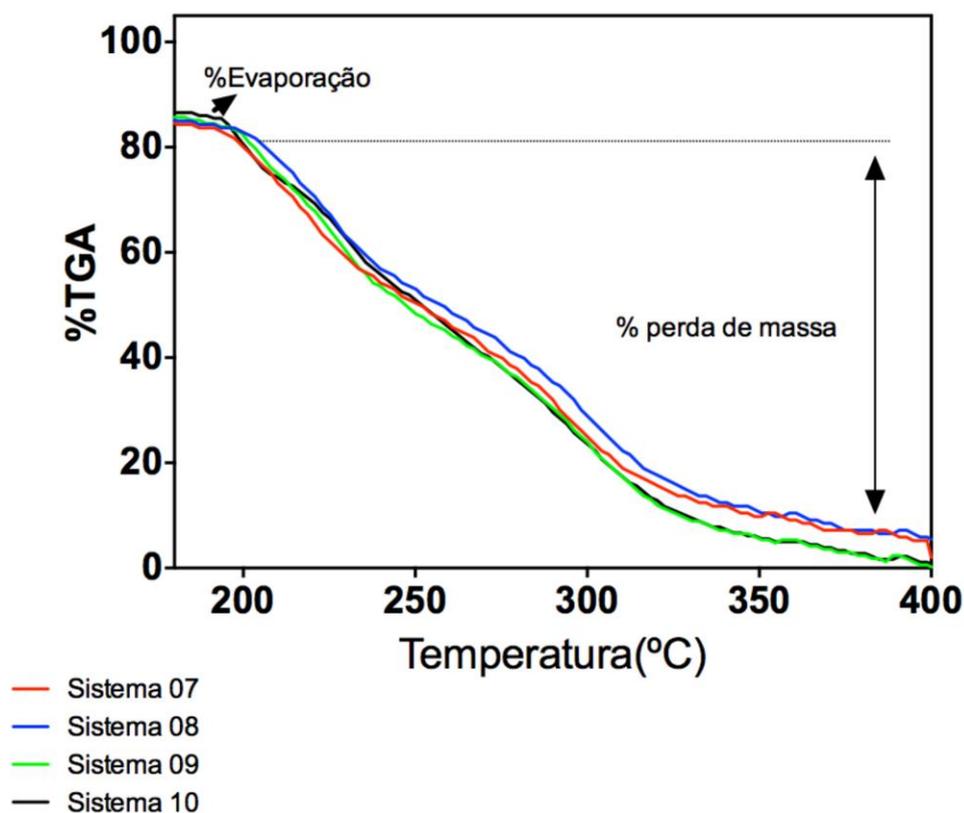


Figura 34: Gráfico normalizado da TGA sistemas 7-10

A diminuição da massa representa na curva de TGA, na figura 34 perfaz em todos os sistemas com perda de massa do polímero no intervalo de 200° a 400°C. Foram realizadas análises termogravimétricas (Figura 34) para os sistemas 7-10 e é possível observar que todas as amostras analisadas apresentaram um estágio inicial de perda de massa entre aproximadamente 60 e 110 °C, referente à perda de umidade presente na amostra, com redução de aproximadamente 5 a 7 % de massa. Esse estágio inicial está relacionado com o fato de os biopolímeros e dos fármacos terem natureza hidrofílica, retendo em sua estrutura moléculas de água, que são liberadas com o aquecimento das amostras. Os sistema 7 e 8 apresentam perda de massa em 400°C de 92%, já a perda de massa é mais acentuada nos sistemas 9 e 10 em 400°C sendo de 99,5%. Este fato é devido a presença das AuNP que se fundem e geram calor no sistema fazendo com que a perda de massa seja maior.

CONCLUSÃO

5.0 Conclusões

Após o estudo de sistema sinérgico contendo o fármaco berberina em matriz polimérica mista na forma de microesferas e associá-lo a nanopartícula de ouro contendo doxorubicina por dois métodos distintos pode-se considerar que:

- O processo de obtenção das microesferas “beads” de alginato recoberta de quitosana foi realizado com o fármaco berberina e avaliado com os parâmetros físico-químicos: fração da água retida (Wf), percentual de hidratação (%DS), hidratação (%H) e Difusão (Dm) adequados;
- As nanopartículas de ouro preparadas pelo método Turchevich modificadas com ions citrato, permitiram a associação eletrostática do antitumoral doxorubicina a sua superfície de forma a não degradar as mesmas ou sofrerem agregação.
- Ao utilizarmos a estratégia de recobrir as nanopartículas de ouro com THPAL e posteriormente adicionar EDC/NHS, tornou estas estruturas com superfície modificada de forma a promover o acoplamento do tipo amida endos grupos carboxílicos do THPAL com a DOX, ligando este fármaco de maneira covalente na AuNP.
- As AuNPs preparadas de maneiras distintas foram avaliadas frente a suas características espectroscópicas tais como UV-vis e FTIR, mostrando que as AuNPs interagem com a DOX por interação eletrostática e covalente.
- As análises térmicas dos sistemas mistos contendo ou não AuNPs mostraram ter transição vítrea no geral até a temperatura de 80°C e que há uma diferença entre os sistemas que contem AuNP quanto a perda de massa (TGA).
- Quanto aos aspectos morfológicos foram obtidas AuNPs de tamanho entre 35-900nm de diâmetro dependendo de sua constituição. As microesferas possuem tamanho

médio de 600 μ m quando secas e 800 μ m quando entumescidas.

- As microesferas mistas apresentam morfologia (MEV) rugosas, com regiões porosas e com forma amorfa. Superficialmente há pouca diferença na superfície das microesferas elaboradas neste trabalho.
- Com base nas características físico-químicas e morfológicas dos sistemas produzidos, pode-se concluir que houve êxito no preparo do sistema sinérgico micro/nanoestruturado capaz de carrear berberina e doxorubicina utilizando dois sistemas de carreamento de drogas (hidrogel e nanopartículas de ouro), tendo um uso potencial em nanobiotecnologia e fototerapia, atuando como um teranóstico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AOUADA, A.F., et al. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. *Química Nova*, v.32, nº 06, p. 1482, 2009.
- AUBIN-TAM, M.E.; HAMAD-SHIFFERLI, K. Gold Nanoparticle Cytochrome c Complexes: The effect of nanoparticle ligand charge on protein structure. *Langmuir*, v.21, n.26, p.12080-12084, 2005.
- AMIN, A.H.; SUBBAIAH, T.V.; ABBASI, K.M. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Cancer Journal Microbiology*, v.15, n.15, p.1067–1076, 1969.
- ATCHE, J., et al. Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli (ácido acrílico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 10, n.3, p. 116-121, 2000.
- BANSODE, S.S., et al. Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev*, v.123, n.23, p. 38–43, 2010.
- BAYOMI, M.A. Aqueous preparation and evaluation of albumin–chitosan microspheres containing indomethacin. *Drug development*, v.56, n.30, p.329–339, 2004.
- BURST, M., et al. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-phase Liquid-Liquid system. *Chem. Soc. Chem. Commun*, p.801-802, 1994.
- CONDE, J., et al. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem*, 2014 | doi: 10.3389/fchem.2014.00048

COUTINHO, D. F., et al. An automated two-phase system for hydrogel microbead production. *Biofabrication*, v.4, n.35, p.10, 2012. (doi:10.1088/1758-5082/4/3/035003).

CHANG, M.Y.; JUANG, R.S. Adsorption of tannic acid, humic acid, and dyes from water using the composite of chitosan and activated clay. *J. Colloid Interface*, v.12, n.278, p.18, 2004.

CHOI, M.S., et al. Berberine Inhibits Human Neuroblastoma Cell Growth through Induction of P53-dependent Apoptosis. *International Journal of Oncology*, v.34, n.13 p.1221, 2009.

CHATTERJEE, S., et al. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochem*, v.40, n.23, p.395, 2005.

CRUZ, A.C., et al. Utilização de acetato de celulose produzido a partir de celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. *SciELO*, v.3.n.45, p.384-340, 2011.

DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical. Rev*, v.104, n.23, p.293, 2004.

FENG, X. *Macromolecules Microgel Suspensions: Fundamentals and Applications*. Califórnia USA: Wiley –VCH, capítulo 12, p. 122, 2007.

FERREIRA, V. Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na Concepção de Novas Arquiteturas contendo Nanopartículas Metálicas: Preparação, Caracterização e Desempenho para Electrocatalise e Biosensores. 2011. 147f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa. 2011.

FUKUDA, K., et al. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *Journal Ethnopharmacology*, v.66, n.12, p. 227-233, 1999.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, v.241, p.20–22, 1973.

FREESTONE, I., et al. The Lycurgus Cup - A Roman Nanotechnology, *Gold Bulletin*, World Gold Council. *Publisher* v.40, n.4, p. 270, 2007.

GASEROD, O.; SMISDROD, G. Microcapsules of alginate–chitosan: A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*, v.19, n.34, p.1815, 1998.

GUIBAL, E. (2008) Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents. *Separation and Purification Technology*, v.38, p.43-74, 2008.

GOTOH, T.; MATSUSHIMA, K.; KIKUCHI, K.I. Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions. *Chemosphere*, v.55, n.34, p.135, 2004.

HAN, J.Y., et al. Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion. *Pharmacology*. v.32, n.117, p.280–295, 2008.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal Control Release Pharmaceutical*, v.8, n.32, p. 253, 2003.

JUNG, A. H.; YOON, Y. Y.; HYUN, B.J. Inhibitory Activities of the Alkaloids from *Coptidis Rhizoma* against Aldose Reductase. *Choi Arch Pharm Res*, v. 31, n.11, p. 1405-1412, 2008.

JINLONG, C., et al. *Anal. Chim. Acta*, p.599, v.134, 2007. *J. Nanopart. Res*, v.12, p.1331, 2007.

JUANG, R.S.; SHAO, J.S. Effect of pH on competitive adsorption of Cu(II), Ni(II), and Zn(II) from water onto chitosan beads. *Adsorption* 8, v.03, n.54, p.71, 2002.

JYOTHI, N.V.N., et al. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, *J. Microencapsul*, v.27, n.23, p.187–197, 2010.

KAMINSKI, W.; MODRZEJEWSKA, Z. (1997). Application of chitosan membranes in separation of heavy metal ions. *Sep. Sci. Technol*, v.32, n.16, p.2659 – 2668, 1997.

KANG, D.G., et al. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *S. Vascular Pharmacology*. v.39, n.6, p.281, 2002.

KIM, M. Y.; YU, H.M. Palmatine from *Coptidis rhizoma* reduces ischemia–reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat. *Food and Chemical toxicology*, v.45, n.34, p.2097–2102, 2009.

KILLICK, D. Optical and electron microscopy in material culture Studies, In: Learning from Things, edited by: W. David Kingery. **Simithonian Institution Press. London**, Chapter 14, p. 204-230, 1999.

LAWRIE, G., et al. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v.8, n.89, p.2533-2541, 2007.

LEE, C.J.; LEE, J.H.; SEOK, J.H. Effects of baicalein, berberine, curcumin and hesperidin on mucin release from airway goblet cells. *Can. J. Microbiology*, v.69, n.13, p.523–526, 2003.

NALWA, H, S. Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology. San Diego: Academic Press, 2002.

NGHIEM, T.H.L., et al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v.132, n.2, p. 25, 2010.– 230, 1999.

NGAH, W.S.W.; FATHINATAN, S. Chitosan flakes and chitosan–GLA beads for adsorption of p-nitrophenol in aqueous solution. *Colloids Surf. A*, v.277, n.12, p. 241, 2006.

NUJEN, B., et al. Progress in development of alternative pharmaceutical formulation of taxanes, *Invest. New Drugs*, v.19, n.23, p.143–153, 2001.

PAIVA, D.L., et al. *Introductions to spectroscopy*, second edition, College Saudres. Publishing USA, 1996.

PAULINO SILVA. Anais da 66ª Reunião Anual da SBPC - Rio Branco, Ac - Julho/2014.

PANDEY, R., et al. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, v.83, n.6, p. 373–378, 2003.

PITTA-ALVAREZ, S.I., et al. In vitro shoot culture and antimicrobial activity of *Berberis buxifolia* Lam. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v.44, n.6, p.502, 2008.

QUAN, J., et al. Characterization of fucoxanthin-loaded microspheres composed of cetyl palmitate-based solid lipid core and fish gelatin–gum Arabic coacervate shell. *Food Res. Int.* v.50, n.32, p.31–37, 2013.

QUINA, H.F. Nanotecnologia e meio ambiente perspectivas e riscos. *Química nova*, v.27, n.12, p.32, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, tradução 5ed. capítulo 08, p.113-119, 2007.

RAFFIN, R. P., et al. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: Estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. *Acta Farm. Bonaerense*, v.13, n.34, p.163-72, 2003.

REBECCA, R. T. S., et al. Sustained Release of an Antitumoral Drug from Alginate-Chitosan Hydrogel Beads and Its Potential Use as Colonic Drug Delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, v.126, n.12, p.409-428, 2012.

ROCHA, A.; LOPES, R.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol*, v.124, n.23, p.364–369, 2010.

ROSI, N.L., et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*, v.312, n.5776, p.1027-1030, 2006.

RODRIGUES, H.A. F., et al. Síntese e caracterização de chitosan- enxerto poli (ácido acrílico) / compósitos de hidrogel nontronite com base em um planejamento de experimentos. *Journal of Applied Polymer S*, v.128, n.05, p. 3480, 2013.

SHARMA, D., et al. Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy. *International Journal of Oncology*, v.8, n.12, p.281–286, 1996.

SHIMODA, J.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Bioadhesive characteristics of chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine. *Drug development. Ind. Pharm.* v.27, n.31, p.567–576, 2001.

SILVERSTEIN, R. M., et.al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

SINGH, M.N., et al. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Science*, v.87, n.18, p.65–77, 2005.

SRIAMORWSAK, P., et al. Alginate-based pellets prepared by extrusion/spheronization: effect of the amount and type of sodium alginate and calcium salts. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*v.69, n.12, p.274–284, 2008.

SARMENTO, B., et al. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm. Res*, v.24, n.23, p.12, 2007.

SPERLING, R. A., et al. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Review*, v.37, n.9, p.1896-1908, 2008.

SCENIHR. (2005). EU Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. *European Commission, Health and Consumer Protection*, Directorate General, September, p.28–29 2005.

SHAMSA, F.; AHMANDIANI, A.; KHOSROKHAVAR, R. Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacol*, v.54, n.64, p.161,1999.

SOUSA, M. H., et al. Slurry sample introduction for determination of ferrite nanocolloids chemical composition by ICP spectrometry. *In: NSTI Nanotech*, Santa Clara. Technical Proceedings of the 2007 Nanotechnology Conference, v.1-7, p. 393-396, 2008.

SHI, X.Y.; TAN, T.W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D2, *Biomaterials*, v.23, p.4469–4473, 2002.

SUN, S.; WANG, A. Adsorption properties of carboxymethyl-chitosan and cross-linked carboxymethyl-chitosan resin with Cu (II) as template. *Sep.Purif. Technol*, v.49,n.10, p.197, 2006.

SZETO, S.; YOW, C.M.N.; FUNG, K.W. Characterization of Berberine on Human Cancer Cells in Culture. *Turk Jur Med Sci*, v.32,n.5, p.363-368, 2002.

TOMELLINI, R. Nanotecnologia: um ponto de vista da Europa. In: MARTINS,P.R.(Org). Nanotecnologia, sociedade e meio ambiente. Trabalhos apresentados ao Segundo Seminário Internacional. São Paulo: Xamã, 2006. p.42, 2006.

TURKEVICH, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold Peter Cooper Stevenson and James Hillier Discuss. Faraday Soc., v.11, p. 55-75, 1951.

THORN, C.F., et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics*, v.21, n.23, p.440–446, 2011.

TIABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. *Naresuan Univ. J*, v.11, n.30, p.51–66, 2003.

TOMA, H.E., et al. The coordination chemistry at gold nanoparticles. *J. Braz. Chem. Soc*, v. 21, n.7, p. 1158-1176, 2010.

VIGDERMAN, L.; EUGENE, R. Z. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Review Article*, p.663-676, 2003.

WEBER, A. S. Síntese de nanopartículas de ouro por precipitação /Alfredo dos Santos Weber.
-- São Carlos : UFSCar, p.60, 2012. doi:10.1016/j.mser.2009.02.002

YAMURA, M., et al. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.02, n.15, p.66, 2004.