



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Química e Biológica

**Elaboração de nanossistemas poliméricos
magneto-responsivos aplicados na liberação de curcumina**

Katiúscia Vieira Jardim

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Brasília – 2018

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Química e Biológica

**Elaboração de nanossistemas poliméricos
magneto-responsivos aplicados na liberação de curcumina**

Katiúscia Vieira Jardim

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Brasília - 2018

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Katiúscia Vieira Jardim**, matrícula nº **14/0106529**, intitulada “***Elaboração de nanossistemas poliméricos magnetoresponsivos aplicados na liberação de curcumina***”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 20 de julho de 2018.

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
Presidente de Banca (FCE/UnB)

Prof. Dr. Alex Fabiano Cortez Campos
Membro Titular (FUP/UnB)

Prof. Dr. José Antônio Huamani Coaquira
Membro Titular (PPGFIS/UnB)

Prof. Dr. Arilson Lehmkuhl
Membro Titular (IFB)

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 20 de julho de 2018.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais José Alberto e Maria Mônica, aos meus irmãos Kelly, Karoly e Kabrinni, às minhas sobrinhas Beatriz e Maria Fernanda e ao meu noivo Abraham.

Agradecimento

A Deus!

Resumo

A curcumina é um composto polifenólico que possui diversos efeitos farmacológicos. No entanto, sua aplicabilidade clínica é dificultada por sua baixa solubilidade em água, rápido metabolismo e baixa biodisponibilidade após a administração oral. Desta forma, este trabalho propôs a encapsulação da curcumina em nanopartículas polimérico-magnéticas com a finalidade de aumentar sua biodisponibilidade e eficiência terapêutica. As nanopartículas magnéticas (NPMs) de MnFe_2O_4 foram sintetizadas via decomposição térmica, revestidas com citrato de sódio e em seguida funcionalizadas com multicamadas de quitosana e alginato de sódio por meio da técnica de deposição *Layer-by-Layer* (LbL). Conforme esperado, as NPMs de MnFe_2O_4 citratadas apresentaram estrutura cristalina com diâmetro de ~12 nm. As NPMs funcionalizadas com polímeros apresentaram distribuição estreita e diâmetro hidrodinâmico em torno de 200 nm. As inversões no potencial zeta (± 30 mV), após cada deposição, confirmaram a adsorção dos polímeros catiônico (quitosana) e aniônico (alginato de sódio) e a estabilidade no nanossistema. A eficiência da funcionalização, bem como as propriedades estruturais, morfológicas e superficiais das NPMs foram ainda confirmadas por meio das técnicas de FTIR, XPS, MET, TGA e ICP-OES. As NPMs antes e após a funcionalização apresentaram um comportamento superparamagnético, ideal para aplicação como sistema de liberação controlada/assistida de fármacos. A eficiência de encapsulação da curcumina foi determinada por espectroscopia de fluorescência, resultando em uma quantidade de ~100 μg de curcumina por mg de nanopartícula. A liberação da curcumina por meio das NPMs funcionalizadas foi avaliada com base nos estímulos temperatura, pH do meio e campo magnético (hipertermia magnética). À medida que aumentou a temperatura e o pH do meio, observou-se um aumento na taxa de liberação da curcumina em um processo de dois estágios, seguindo o modelo descrito por Gallagher–Corrigan. Ao aplicar o campo magnético foi constatado que a interação interpartícula magnética reduzida na estrutura polimérica desempenhou uma liberação mais acelerada, quando comparado aos estímulos de temperatura e pH, via mecanismo de difusão, seguindo o modelo de liberação de primeira ordem. A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* da curcumina foi determinada por meio do teste de MTT, observando que a curcumina livre e nanoencapsulada reduziram significativamente ($P < 0,0001$) a viabilidade da célula MCF-7 no período de 72h. Os ensaios de nanocitotoxicidade mostraram ainda que o revestimento de polímero aumentou a biocompatibilidade do nanossistema. Após 6h de exposição observou-se a partir das imagens de MET a internalização das amostras (curcumina livre e MC@3Curc) no citoplasma, nas vesículas e dentro do núcleo da célula MCF-7, apresentando, desta forma, sinais de citotoxicidade. Esses resultados sugerem o potencial do nanossistema polimérico-magneto-responsivo sintetizado como uma alternativa para liberação da curcumina para fins biomédicos.

Palavras-chave: Nanopartícula magnética, curcumina, quitosana, alginato de sódio, *Layer-by-Layer* (LbL), liberação controlada/assistida de fármaco.

Abstract

Curcumin is a polyphenolic compound that has several pharmacological effects. However, its clinical applicability is hampered by its low water solubility, rapid metabolism and low bioavailability after oral administration. Thus, this work proposed the encapsulation of the curcumin in polymer-magnetic nanoparticles in order to increase their bioavailability and therapeutic efficiency. The magnetic nanoparticles (MNPs) of MnFe_2O_4 were synthesized by thermal decomposition, coated with sodium citrate and then functionalized with chitosan and sodium alginate multilayers by the Layer-by-Layer (LbL) deposition technique. As expected, the citrated MnFe_2O_4 MNPs showed a crystalline structure with a diameter of ~ 12 nm. The MNPs functionalized with polymers showed a narrow distribution and hydrodynamic diameter around 200 nm. The inversions at the zeta potential (± 30 mV) after each deposition confirmed the adsorption of the cationic (chitosan) and anionic (sodium alginate) polymers and the stability in the nanosystem. The efficiency of the functionalization, as well as the structural, morphological and superficial properties of the MNPs were further confirmed by the FTIR, XPS, TEM, TGA and ICP-OES techniques. The MNPs before and after functionalization showed a superparamagnetic behavior, ideal for application as a controlled/assisted drug delivery system. The encapsulation efficiency of curcumin was determined by fluorescence spectroscopy, resulting in an amount of ~ 100 μg of curcumin per mg of nanoparticle. The release of curcumin by functionalized NPMs was evaluated based on the stimuli of temperature, pH of the medium and magnetic field (magnetic hyperthermia). As the temperature and pH of the medium increased, an increase in the release rate of curcumin was observed in a two-stage process, following the model described by Gallagher-Corrigan. When applying the magnetic field, it was observed that the reduced magnetic interparticle interaction in the polymer structure showed a more rapid release when compared to the temperature and pH stimuli, via diffusion mechanism, following the model of first-order release. The evaluation of the in vitro cytotoxic activity of curcumin was determined by the MTT test, observing that free and nanoencapsulated curcumin reduced significantly ($P < 0.0001$) the viability of MCF-7 cells within 72h. After 6h of exposure, the internalisation of the samples (free curcumin and MC@3Curc) in the cytoplasm, vesicles and inside the nucleus of the MCF-7 cells was observed through of the images of MET, thus showing signs of cytotoxicity..The nano-cytotoxicity assays further showed that the polymer coating increased the biocompatibility of the nanosystem. These results suggest the potential of synthesized polymer-magnetic MNPs as an alternative for release of curcumin for biomedical purposes.

Keywords: Magnetic nanoparticle, curcumin, chitosan, sodium alginate, Layer-by-Layer (LbL), controlled/assisted release of drug.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	12
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	13
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLO E ABREVIATURAS	14
APRESENTAÇÃO DA TESE	15
CAPÍTULO I	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Justificativa.....	17
1.2. Objetivo geral	18
1.3. Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO II	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Curcumina	21
2.2. Nanopartículas magnéticas	23
2.3. Quitosana	29
2.4. Alginato	30
2.5. Liberação controlada e direcionada de fármacos	32
CAPÍTULO III	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Materiais.....	42
3.2. Método	42
3.2.1. Síntese de nanopartículas magnéticas.....	42
3.2.2. Preparação de soluções.....	43
3.2.3. Determinação do pKa e da densidade de carga superficial	43
3.2.4. Avaliação da interação entre os polímeros.....	45
3.2.5. Funcionalização da amostra MC0 e encapsulação da curcumina.....	45
3.2.6. Métodos de caracterização	47
3.2.6.1. Determinação da fração volumétrica das NPMs (ϕ)	47
3.2.6.2. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)	48
3.2.6.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta	48
3.2.6.4. Difração de Raios X (DRX)	49
3.2.6.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	49
3.2.6.6. Análise porosimétrica e da área superficial por Brunauer-Emmett-Teller (BET)	49
3.2.6.7. Determinação do pKa das NPMs funcionalizadas com polímeros	50
3.2.6.8. Potencial zeta em função do pH.....	50
3.2.6.9. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	50
3.2.6.10. Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS)	51
3.2.6.10. Análise da composição química	51
3.2.6.11. Análise termogravimétrica (TGA)	51
3.2.6.12. Medidas de magnetização.....	52
3.2.7. Caracterização da curcumina.....	52
3.2.7.1. Comportamento espectroscópico da curcumina	52

3.2.7.2. Curva de calibração da curcumina	53
3.2.8. Desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação da curcumina.....	53
3.2.8.1. Equipamento	53
3.2.8.2. Validação do método.....	53
3.2.8.3. Determinação da eficiência de encapsulação	55
3.2.9. Estudo de liberação controlada/assistida <i>in vitro</i> da curcumina	55
3.2.9.1. Estímulo de pH e de temperatura.....	55
3.2.9.2. Estímulo de campo magnético (magnetohipertermia)	56
3.2.10. Teste biológico	57
3.2.10. Avaliação da atividade citotóxica.....	57
3.2.10. Estudo de internalização das amostras nas células MCF-7	58
CAPÍTULO IV.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
4.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD).....	60
4.2. Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	61
4.3. Determinação do pKa e da densidade de carga superficial	64
4.4. Avaliação da interação entre os polímeros.....	68
4.5. Caracterização das NPMs funcionalizadas com polímeros.....	70
4.5.1. Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta.....	70
4.5.2. Potencial zeta em função do pH.....	72
4.5.3. Determinação do pKa.....	73
4.5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	75
4.5.5. Análise porosimétrica e da área superficial por Brunauer-Emmett-Teller (BET)	77
4.5.6. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	80
4.5.7. Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS)	83
4.5.8. Análise termogravimétrica (TGA)	87
4.5.9. Medidas de magnetização.....	90
4.6. Caracterização da curcumina.....	92
4.6.1. Comportamento espectroscópico da curcumina	92
4.6.2. Curva de calibração da curcumina	94
4.7. Desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação da curcumina.....	95
4.7.1. Validação do método.....	95
4.7.2. Determinação da eficiência de encapsulação	96
4.8. Estudo de liberação controlada/assistida <i>in vitro</i> da curcumina	97
4.8.1. Estímulo de pH e de temperatura.....	98
4.8.2. Estímulo de campo magnético (magnetohipertermia)	103
4.9. Teste biológico	107
4.9.1. Avaliação da atividade citotóxica.....	107
4.9.2. Estudo de internalização das amostras nas células MCF-7	109
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	111
5.1. Conclusão	111
5.2. Perspectivas.....	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos curcuminóides extraídos do rizoma da <i>Cúrcuma Longa L.</i> (A) Curcumina, (B) Demetoxicurcumina (C) Bisdemetoxicurcumina	21
Figura 2 – Equilíbrio ceto-enol da curcumina	22
Figura 3 – Representação da estrutura cristalina do espinélio $MgAl_2O_4$	24
Figura 4 – Propriedades magnéticas dos materiais na presença/ausência do campo magnético	26
Figura 5 – Curva de histerese	26
Figura 6 – Variação do número de domínios em relação ao diâmetro das partículas.....	27
Figura 7 – Representação de NPMs revestidas com polímeros pH e termoresponsivo, carregadas com um fármaco hidrofóbico.....	28
Figura 8 – Conversão da quitina em quitosana via reação de desacetilação.....	29
Figura 9 – Estrutura química do alginato de sódio	30
Figura 10 – Formação de complexo polieletrólítico entre a quitosana e o alginato.....	32
Figura 11 – Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo.....	33
Figura 12 – Sistema nanocarreador polimérico-magnético de fármacos.....	37
Figura 13 – Resposta térmica do nanossistema polimérico-magnético em relação ao campo magnético aplicado.....	39
Figura 14 – Representação esquemática do sistema de síntese da $MnFe_2O_4$ por decomposição térmica.. ..	43
Figura 15 – Esquema ilustrativo de obtenção de amostras brancas e contendo curcumina por meio da técnica de deposição LbL.	46
Figura 16 – Curva de titulação condutimétrica obtida para a quitosana	60
Figura 17 – Difratoograma de raios X obtido para a amostra MC0	62
Figura 18 – Imagem de MET obtida para a amostra MC0	63
Figura 19 – Histograma de distribuição do diâmetro obtido para a amostra MC0 ...	63
Figura 20 – Curvas de titulação potenciométrica (●) e condutimétrica (○) obtidas para as amostras: (a) MC0, (b) QTS e (c) ALG	65
Figura 21 – Diagrama de especiação dos sítios superficiais de MC0 (azul), QTS (verde) e ALG (vermelho) em função do pH	67
Figura 22 – Desenho esquemático de um cristal de quartzo QCM-D.....	68
Figura 23 – Massa depositada no cristal de QCM-D em função da variação da frequência de ressonância para: (a) QTS/ALG e (b) QTS-Curc/ALG.....	69
Figura 24 – Diâmetro hidrodinâmico (a) e potencial zeta (b) em função do número de camadas de polímeros. Amostras brancas (esferas azuis) e amostras contendo curcumina (esferas vermelhas).....	70
Figura 25 – Potencial zeta em função do pH obtido para as amostras brancas (a) e para as amostras contendo curcumina (b).....	72
Figura 26 – Curvas de titulação potenciométrica (●) e condutimétrica (○) obtidas para as amostras funcionalizadas.....	74
Figura 27 – Microscopia eletrônica de transmissão obtida para a amostra MC@4 com diferentes ampliações	76
Figura 28 – Isotermas de adsorção/dessorção obtidas por BET para a amostra MC0 antes e após a funcionalização com polímeros	77

Figura 29 – Espectros de FTIR obtidos para: (a) amostras brancase (b) amostras contendo curcumina e, seus respectivos constituintes.....	81
Figura 30 – Espectros de XPS obtidos para as amostras funcionalizadas e seus respectivos constituintes	84
Figura 31 – Análise termogravimétrica obtida para: (a) amostras brancase (b) amostras contendo curcumina e, seus respectivos constituintes.....	87
Figura 32 – Curvas de magnetização de saturação obtidas para: (a) amostras brancase (b) amostras contendo curcumina	90
Figura 33 – Equilíbrio ácido-base da curcumina.....	92
Figura 34 – Comportamento da curcumina em diferentes pHs observado por: (a) Espectroscopia de UV-Vis e (b) Espectroscopia de fluorescência.....	93
Figura 35 – Curva de calibração obtida para a curcumina preparada em: (a) solução 0,1 mol/L de NaH ₂ PO ₄ a pH 7,4:etanol e (b) solução 0,1 mol/L de HCl a pH 1,2:etanol.....	94
Figura 36 – Espectro de fluorescência obtido para a curcumina e para as amostras brancas.....	95
Figura 37 – Perfil de liberação da curcumina por meio das NPMs funcionalizadas obtido a partir do estímulo de pH e de temperatura.....	99
Figura 38 – Representação do <i>fitting</i> obtido para a amostra MC@4Curc com a aplicação de modelos matemáticos	102
Figura 39 – Variação de temperatura em função do tempo obtida para a amostra MC0, amostras brancas, QTS/ALG e QTS-Curc/ALG submetidas a um campo magnético alternado	104
Figura 40 – Perfil de liberação da curcumina a partir das NPMs polimérico-magnéticas obtido após a aplicação do campo magnético	105
Figura 41 – Representação do <i>fitting</i> obtido para a amostra MC@4Curc com a aplicação do modelo matemático de primeira ordem	106
Figura 42 – Porcentagem de viabilidade celular das células MCF-7 na presença de: (a) curcumina livre e nanoencapsulada e (b) amostras brancas. Significativamente diferente do controle: * $P < 0,0001$	107
Figura 43 – Micrografias eletrônicas de transmissão obtidas para as células MCF-7 expostas a: (a) curcumina livre (escala = 2 μm), (b) amostra MC@3Curc (escala = 0,5 μm) e, (c) células MCF-7 não tratadas (escala = 1 μm) durante o período de 6 h.....	110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre o expoente difusional n e o mecanismo de liberação para os diferentes sistemas de liberação controlada	35
Tabela 2 – Resumo das condições utilizadas para produzir as amostras brancas e contendo curcumina.	46
Tabela 3 – Valores de pK_a e de densidade de carga superficial.	67
Tabela 4 – Características das amostras funcionalizadas	71
Tabela 5 – Resultados de porosidade obtidos por BET para a amostra MCO antes e após a funcionalização com polímeros	79
Tabela 6 – Composição química da superfície em (% at) obtida por XPS para as amostras funcionalizadas e seus respectivos constituintes	86
Tabela 7 – Perda de massa obtida por TGA e porcentagem de $MnFe_2O_4$ obtida por ICP-OES.....	89
Tabela 8 – Valores de magnetização de saturação obtidos para a amostra MCO antes e após a funcionalização com polímeros.....	90
Tabela 9 – Resultados de exatidão e precisão, obtidos a partir do método de quantificação desenvolvido	96
Tabela 10 – Eficiência de encapsulação, quantidade de curcumina e recuperação, obtidos a partir do método de quantificação	97
Tabela 11 – Resultados obtidos para liberação da curcumina, utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas	101
Tabela 12 – Resultados obtidos para liberação da curcumina, utilizando o modelo de Gallagher-Corrigan	101
Tabela 13 – Viabilidade celular obtida para as células MCF-7 nas diferentes concentrações da curcumina livre, amostras brancas e amostras contendo curcumina no período de 72 horas.....	108

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação descrita para cinética de liberação de primeira ordem	34
Equação 2 – Equação semi-empírica para o modelo de liberação de Korsmeyer-Peppas.....	35
Equação 3 – Equação para o modelo de liberação de Gallagher-Corrigan.....	36
Equação 4 – Equação para geração de calor dada pelas correntes parasitárias...	38
Equação 5 – Equação para geração de calor no processo de magnetização e desmagnetização	38
Equação 6 – Equação para geração de calor determinada pelo momento magnético.....	38
Equação 7 – Determinação da densidade de carga superficial.....	44
Equação 8 – Determinação da massa depositada no cristal de QCM-D.....	45
Equação 9 – Determinação da fração volumétrica das NPMs.....	47
Equação 10 – Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)	48
Equação 11 – Determinação da viabilidade celular (%)	58
Equação 12 – Determinação do diâmetro médio das NPMs por DRX	62
Equação 13 – Determinação do diâmetro médio das NPMs por MET	64

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURA

ALG	Alginato de sódio
ANOVA	Variância amostral
BET	Brunauer–Emmett–Teller
CMA	Campo magnético alternado
Curc	Curcumina
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRX	Difração de Raios X
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GD	Grau de desacetilação
ICP-OES	Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma
LbL	Layer-by-layer (Camada a camada)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCF-7	Linhagem de Célula Tumoral Humana de Mama
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NPMs	Nanopartículas magnéticas
MS	Magnetização de saturação
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-
PDI	Índice de Polidispersão
PEC	Complexo polieletrólítico
pH	Potencial de hidrogênio
pKa	Constante de dissociação ácida
%EE	Eficiência de encapsulação em porcentagem
%GD	Grau de desacetilação em porcentagem
QCM-D	Microbalança de cristal de quartzo
QTS	Quitossana
R ²	Coefficiente de correlação
rpm	Rotação por minuto
TGA	Análise Termogravimétrica
UV-Vis	Ultravioleta na região do visível
VSM	Magnetômetro de amostra vibrante
XPS	Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X
Å	Ångström
~	Aproximadamente
λ_{\max}	Comprimento de onda de absorção
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
Δ	Delta
σ_0	Densidade de carga superficial
ϕ	Fração Volumétrica
γ	Gama
μ	Micro

Apresentação da Tese

A presente Tese está organizada em capítulos, nos quais estão descritos os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento do nanossistema biopolimérico-magnético, bem como os resultados obtidos. O capítulo I apresenta uma introdução, contendo a justificativa e os objetivos propostos para o trabalho. No Capítulo II foi realizada uma revisão bibliográfica acerca dos principais tópicos abordados ao longo da Tese. No Capítulo III foram descritos os procedimentos experimentais realizados para obtenção do nanossistema biopolimérico-magnético, as técnicas utilizadas para caracterização do nanossistema e seus respectivos constituintes, além da caracterização, quantificação, estudo de liberação e aplicação biológica da curcumina nanoencapsulada. Os resultados obtidos e as discussões estão apresentados no Capítulo IV. Finalmente constam as conclusões acerca do trabalho, as perspectivas futuras e as referências bibliográficas utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

Apesar dos inúmeros efeitos benéficos trazidos pela utilização das nanopartículas magnéticas (NPMs), elas também podem gerar alguns efeitos tóxicos, como por exemplo, a produção exagerada de radicais livres, resultando na indução de estresse oxidativo.¹ No entanto, esses efeitos tóxicos podem ser minimizados por meio da funcionalização da grande área superficial das NPMs, gerando um sistema do tipo *core-shell*. Esses sistemas são formados por nanopartículas com um núcleo magnético, recobertos com um material que pode ser lipossomas, oligossacarídeos cíclicos, sílica, peptídeos ou polímeros.²

O núcleo magnético permite o aquecimento térmico no processo denominado hipertermia magnética, em resposta à aplicação de um campo magnético externo, podendo, assim, ser utilizado para diversas aplicações biológicas, dentre elas, a liberação magneto-assistida de fármacos.³ Os recobrimentos por sua vez aumentam a estabilidade e a biocompatibilidade das NPMs em meio biológico, diminuindo as chances de serem endocitadas por células de defesa.⁴

Atualmente, amplo destaque tem sido dado às NPMs recobertas com polímeros por meio da técnica de deposição camada a camada (*Layer-by-Layer* - LbL), a qual permite a adsorção alternada de polycations e poliânions, criando multicamadas sobre a superfície das NPMs.⁵ Cada polieletrólito adsorvido conduz a uma inversão de carga necessária para a adsorção do polieletrólito depositado em seguida.⁶ Entre os polímeros utilizados para esta finalidade estão a quitosana (QTS) e o alginato de sódio (ALG).⁷

A quitosana e o alginato de sódio são polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, biomiméticos e possuem grupos amina e carboxílicos⁸, respectivamente, capazes de interagir entre si, formando complexos polieletrólíticos com maior resistência mecânica a baixos valores de pH, em que o quitosana é solúvel, devido à forte interação entre as cadeias dos polímeros.⁹ Além disso, podem interagir com a estrutura de fármacos hidrofóbicos, aumentando sua aplicação em meio biológico.¹⁰ Desta forma, o fármaco pode ser depositado intercaladamente nas camadas dos polímeros no

processo de deposição por LbL, formando, assim, um nanossistema polimérico magneto-responsivo, que pode ser utilizado como sistema de liberação por hipertermia magnética.¹¹

A curcumina, por exemplo, é um fármaco fluorescente, que vem sendo investigado para a prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo o câncer.¹² No entanto, é pouco solúvel em soluções aquosas, exibe uma alta taxa de decomposição em pH alcalino e é suscetível à degradação fotoquímica.¹³ Do efeito, várias estratégias têm sido estudadas para aumentar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua ação terapêutica.¹⁴⁻¹⁹

Todavia, a síntese de formulações reprodutíveis com encapsulação eficiente da curcumina e perfis controlados de liberação continua sendo um grande desafio para sua aplicação clínica. Além do que, ainda não foi realizado muito esforço na aplicação da técnica de deposição LbL para produção de nanossistemas poliméricos magneto-responsivo para liberação magnética-controlada da curcumina, via hipertermia magnética.

1.2. Objetivo geral

Tendo em vista os desafios ainda existentes na obtenção de sistemas eficientes para encapsulação e liberação controlada/assistida da curcumina, este estudo propôs a elaboração de um nanossistema magneto-responsivo, que consiste em nanopartículas de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$), dispersas de forma homogênea, em camadas intercaladas de quitosana e alginato de sódio, depositadas por meio da técnica *Layer-by-Layer*, para a liberação magneto-assistida *in vitro* da curcumina, visando melhorar sua viabilidade celular no tratamento de câncer.

1.3. Objetivos específicos

Considerando o alcance do objetivo geral deste trabalho, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- I. Sintetizar as NPMs de $MnFe_2O_4$ por meio do método de decomposição térmica e modificar sua superfície com citrato;

- II. Funcionalizar a superfície das NPMs citratadas com quitosana e alginato de sódio, bem como encapsular a curcumina nas NPMs polimérico-magnéticas por meio da técnica de deposição LbL;
- III. Caracterizar as NPMs citratadas antes e após a funcionalização com polímeros por meio das seguintes técnicas: Difração de Raios X (DRX), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Análise porosimétrica e da área superficial por Brunauer-Emmerr-Teller (BET), Medidas de magnetização, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS), Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e Análise Térmica (TGA);
- IV. Avaliar o comportamento espectroscópico da curcumina por meio das técnicas de Espectroscopia de UV-Vis e de Fluorescência;
- V. Desenvolver e validar um método analítico baseado na técnica de Espectroscopia de Fluorescência para quantificar o teor de curcumina presente nas NPMs polimérico-magnéticas;
- VI. Estudar o perfil de liberação da curcumina *in vitro* por meio das NPMs polimérico-magnéticas, utilizando a temperatura, o pH e o campo magnético (hipertermia magnética) como estímulos, via técnica de Espectroscopia de Fluorescência;
- VII. Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* e a interanlização da curcumina livre e nanoencapsulada na célula tumoral humana de mama (MCF-7).

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Curcumina

A curcumina (1,7bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5 diona) é o principal polifenol biologicamente extraído do rizoma da *Curcuma Longa Linn*, popularmente conhecida na cultura indiana como açafrão.²⁰ A curcumina disponível comercialmente é composta pela mistura de 77% de curcumina, 17% de demetoxicurcumina e 6% de bisdemetoxicurcumina. Estes três pigmentos curcuminóides (Figura 1) são análogos estruturalmente, pertencem à classe diferoluilmetano (C₂₁H₂₀O₆) e apresentam efeito sinérgico entre si, isto é, quando utilizados em conjunto o efeito é maior que a soma dos efeitos de cada um dos curcuminóides aplicados isoladamente.²¹

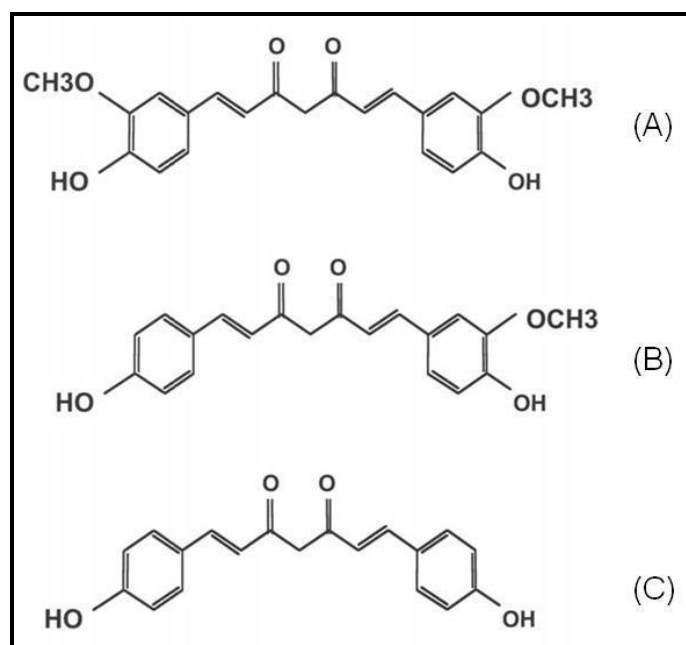


Figura 1 – Estrutura química dos curcuminóides extraídos do rizoma da *Cúrcuma Longa L.* (A) Curcumina, (B) Demetoxicurcumina e (C) Bisdemetoxicurcumina. (Adaptada de: Sueth-Santiago et al.²²).

A Curcumina possui três grupos funcionais: uma porção β -dicetona, dois grupos fenólicos e duas ligações duplas conjugadas.²³ Quimicamente exibe um equilíbrio ceto-enólico na porção β -dicetona (Figura 2) com predominância da forma enol (mais estável) em pH de 3,0 à 7,0, devido à presença de uma

ligação de hidrogênio intramolecular e de uma maior planaridade da molécula, atuando, desta forma, como potente doador de prótons.²⁴

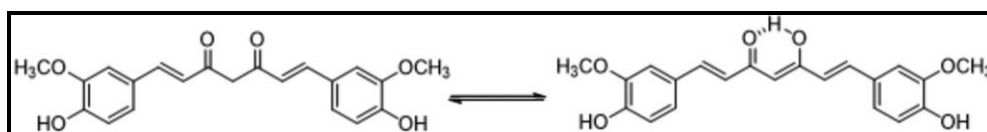


Figura 2 – Equilíbrio ceto-enol da curcumina. (Adaptada de: Rao e Khanum²⁴).

Em pH acima de 8,0, a forma enólica da curcumina predomina, atuando como doador de elétron.²³ No entanto, em pHs alcalinos, a curcumina é instável, uma vez que nesta faixa de pH as velocidades de degradação hidrolítica do corante são relativamente rápidas.²⁴

A curcumina possui baixa massa molar (368,38 g/mol), temperatura de fusão entre 170 e 177°C e boa solubilidade em meio alcalino e em solventes orgânicos. Apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 429 nm e fluorescência amarela sob luz ultravioleta, sendo relativamente estável ao calor e instável quando exposta a luz.²⁵

Em sua composição química há grupos fenóis e metoxi, que são responsáveis pelas suas propriedades biológicas e farmacológicas, tais como, ação antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipolipodérmica, antioxidante, antitumoral, anticarcinogênica, dentre outras.^{26,27}

Apesar de nos últimos anos, a curcumina ter atraído a atenção de diversos pesquisadores devido ao seu potencial na prevenção e tratamento de diversos tipos de tumores, constituindo um bom exemplo de fármaco de origem natural e toxicologicamente inerte às células,²⁸ este corante é insolúvel em água e se degrada facilmente, o que limita sua eficiência terapêutica.²⁹ Diante disso, estudos têm sido realizados com o intuito de tornar a curcumina biodisponível, permeável e resistente a processos metabólicos.³⁰⁻³²

*Mancarella et al.*³³, por exemplo, produziram nanopartículas de óxido de ferro, revestidas com dextrano/poli(L-lisina), produzidas pela técnica de deposição LbL e utilizadas como nanocarreadores para encapsulação da curcumina. Tais autores realizaram a liberação da curcumina em pH fisiológico e testaram o nanossistema em linhagem celular de câncer de ovário para demonstrar sua eficácia terapêutica. Em outro trabalho, a curcumina foi

encapsulada em poli(vinilpiridona) e em ácido hialurônico por *Manju et al.*³⁴ para sintetizar conjugados catiônicos e aniônicos, os quais foram utilizados para modificar as nanopartículas de óxido de ferro por meio da técnica de deposição LbL. Os autores mostraram que a referida estratégia parece ter um potencial substancial na encapsulação e no transporte da curcumina para alvos especificados. *Manatunga et al.*³⁵, relataram a preparação de um composto de nanopartículas de óxido de ferro revestido com bicamada de hidroxiapatita e alginato de sódio sensível ao pH, para encapsular moléculas de curcumina. O comportamento de liberação *in vitro* da curcumina também foi estudado em função do pH.

Estas e outras pesquisas demonstram que a utilização de nanopartículas magnéticas revestidas com materiais biocompatíveis constitui uma interessante alternativa para encapsulação e liberação da curcumina. Além disso, este tipo de sistema pode aumentar a estabilidade do fármaco em fluídos biológicos³⁶, prevenir contra a oxidação/degradação no trato gastrointestinal³⁷, reduzir os efeitos colaterais³⁸ e distribuí-lo de forma controlada e direcionada.³⁴

2.2. Nanopartículas magnéticas

Os sistemas magnéticos são constituídos de nanopartículas magnéticas, as quais podem estar dispersas em meios sólidos (sólidos granulares) ou em meios líquidos (fluidos magnéticos ou ferrofluidos).³⁹ No caso dos sólidos granulares, as matrizes nas quais as NPMs estão imersas podem ser condutoras ou isolantes, cristalinas ou amorfas. Já no caso dos ferrofluidos, as NPMs se encontram dispersas em um líquido carreador. Esses materiais vêm sendo amplamente estudados, pois adquirem propriedades comuns aos líquidos e assumem as propriedades das NPMs dispersas. Além do mais, sua magnetização é comparada a dos cristais magnéticos sólidos.⁴⁰

As NPMs podem ter seu diâmetro controlado, de poucos nanômetros a dezenas de nanômetros, adquirindo diâmetros menores ou iguais a uma célula (10-100 μm), a um vírus (20-450 nm), a uma proteína (5-50 nm) ou a um gene (2 nm de largura e 10-100 nm de comprimento).⁴¹ Também podem ser formadas por diferentes tipos de ferritas cúbicas que apresentam a expressão geral MFe_2O_4 , na qual M é um metal divalente (M^{2+}) que compõe o óxido (M =

Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Sn^{2+} e etc).⁴² As ferritas apresentam a configuração do tipo espinélio (Figura 3), pois possuem conformação cristalina semelhante ao cristal $MgAl_2O_4$.

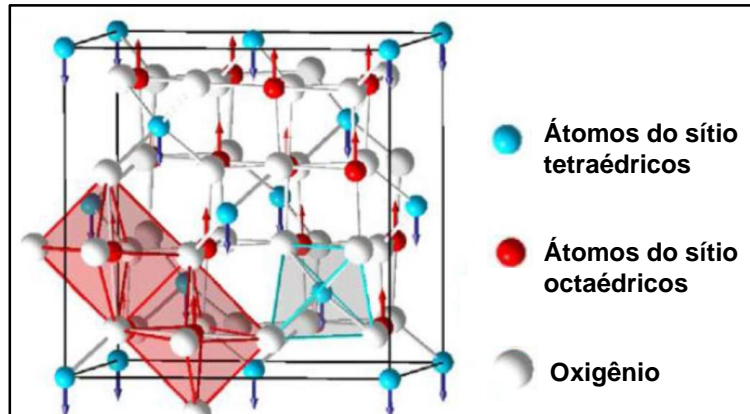


Figura 3 – Representação da estrutura cristalina do espinélio $MgAl_2O_4$. (Adaptada de Harris et al.⁴³).

Na estrutura do espinélio existem 96 interstícios entre os ânions na célula unitária cúbica, porém o empacotamento cúbico de face centrada forma 64 interstícios com simetria tetraédrica e 32 com simetria octaédrica.⁴³ Desta forma, apenas 1/8 dos sítios tetraédricos são ocupados por átomos metálicos divalentes e 1/2 dos sítios octaédricos são preenchidos por átomos de ferro na sua forma trivalente.⁴⁴

De maneira geral, as ferritas com estrutura de espinélio podem ser descritas como: $(M_xFe_{1-x})[M_{1-x}Fe_{1-x}]O_4$, em que x é o fator de distribuição do cátion. O sítio tetraédrico é representado no primeiro parênteses e o colchete representa o sítio octaédrico. Assim, as ferritas espinélio normais, $x = 1$, com todos os cátions divalentes (M^{2+}) nos sítios tetraédricos e os cátions trivalentes (Fe^{3+}) nos sítios octaédricos podem ser representados pela fórmula: $(M^{2+})[Fe^{3+}Fe^{3+}]O_4$. Porém, quanto $x = 0$, indica que a ferrita é do tipo espinélio inversa, com fórmula $(Fe^{3+})[M^{2+}Fe^{3+}]O_4$, na qual os cátions divalentes ocupam metade dos sítios octaédricos e os cátions trivalentes são igualmente divididos entre os sítios octaédricos e tetraédricos. Há ainda ferritas do tipo espinélio misto, $0 \leq x \leq 1$, em que os cátions divalentes e trivalentes se distribuem igualmente entre os sítios tetraédricos e octaédricos, conforme representado pela fórmula: $(M^{2+}Fe^{3+})[M^{2+}Fe^{3+}]O_4$.⁴⁵

De maneira particular, a ferrita de manganês (MnFe_2O_4) possui estrutura cristalina do tipo espinélio normal ($\text{M}^{2+}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$), sendo um dos tipos de materiais magnéticos mais utilizados em diversas aplicações biotecnológicas nos últimos anos.⁴⁶ Além do que, possui elevado potencial no tratamento com hipertermia magnética e propriedades de biocompatibilidade.⁴⁷

Os métodos químicos de síntese das nanopartículas de óxido de ferro distinguem-se em: decomposição térmica, microemulsão, coprecipitação, sol-gel, reações sonoquímicas, reações hidrotérmicas, precursores em termólises e hidrólises e síntese por injeção de fluxo e eletrospray.⁴⁸⁻⁵⁰ Cada método possui inúmeras vantagens e desvantagens, sendo, assim, sua utilização dependerá, certamente, da aplicação a qual as NPMs se destinam.⁵¹

Para obtenção de NPMs com controle do diâmetro e da morfologia, a decomposição térmica tem sido o método mais indicado.⁵¹ Este método baseia-se na decomposição da mistura de $\text{Fe}^{3+}/\text{M}^{2+}$ em alta temperatura de ebulição do solvente orgânico não polar, na presença de agentes tensoativos para evitar a oxidação das NPMs e em atmosfera inerte. Ou seja, a monodispersão das NPMs pode ser facilmente alcançada por meio do controle de parâmetros experimentais, a exemplo, temperatura da reação, tempo de aquecimento, sistema de agitação e concentração dos precursores.⁵²

Desta forma, a síntese das NPMs consiste em uma etapa determinante para se obter sucesso nas aplicações, uma vez que no processo de elaboração, as propriedades físicas, químicas e biológica são definidas.⁵³

As propriedades de nanomateriais magnéticos resultam tanto de características intrínsecas quanto das interações entre partículas e estão correlacionadas com os seus momentos magnéticos (μ), oriundos da dinâmica dos elétrons presentes nos átomos e são associados ao número de elétrons desemparelhados.⁵⁴

A forma como os materiais reagem na presença ou ausência de um campo magnético indica sua susceptibilidade magnética. Ou seja, sua magnetização, permite classificar seu comportamento magnético em: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos e ferrimagnéticos⁵⁵, conforme apresentado na Figura 4.

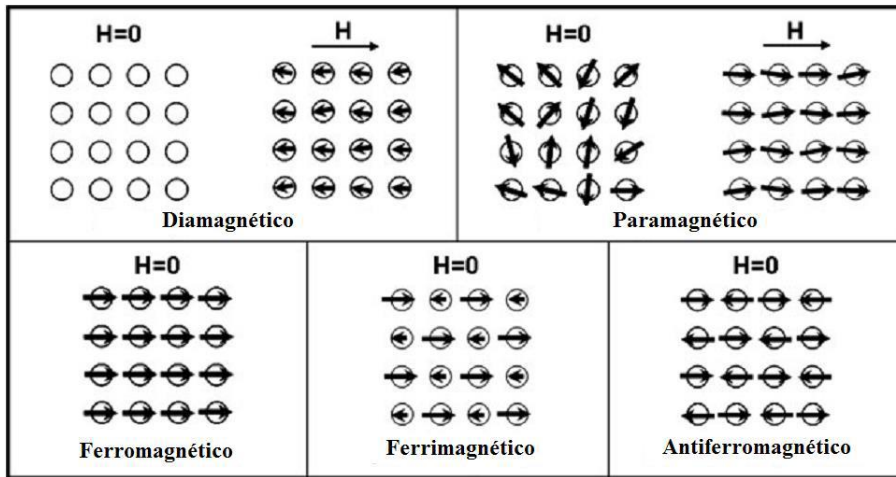


Figura 4 – Propriedades magnéticas dos materiais na presença/ausência do campo magnético. (Hunter⁵⁵).

As propriedades magnéticas dos materiais ferromagnéticos ou ferrimagnéticos podem ser representadas, de forma sucinta, pela curva de histerese, Figura 5.

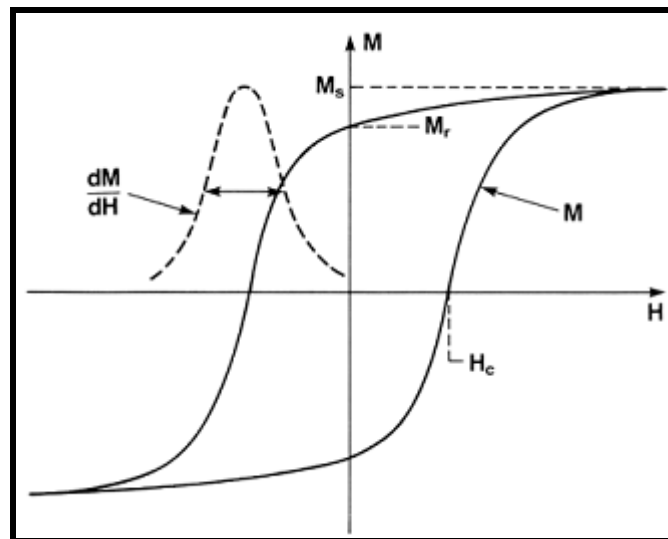


Figura 5 – Curva de histerese. (Hunter⁵⁵).

A partir da curva de histerese pode-se identificar a magnetização de saturação M_s , ou seja, o valor máximo de M ; a magnetização residual M_r em relação à intensidade de campo zero; e a coercitividade H_c , o campo externo necessário para levar a magnetização a zero.⁵⁵

No entanto, o magnetismo das nanoestruturas é muito sensível aos seus diâmetros, às suas formas e à temperatura a qual são submetidas.⁵⁶ Quando o diâmetro das partículas diminui, verifica-se que abaixo de um determinado

valor designado por diâmetro crítico, e também por razões energéticas, ocorre a organização dos dipolos magnéticos em um único domínio magnético (um monodomínio), conforme visualizado na Figura 6, alterando, assim, o seu comportamento. Esta mudança nas suas propriedades físicas é designada como superparamagnetismo.⁵⁷

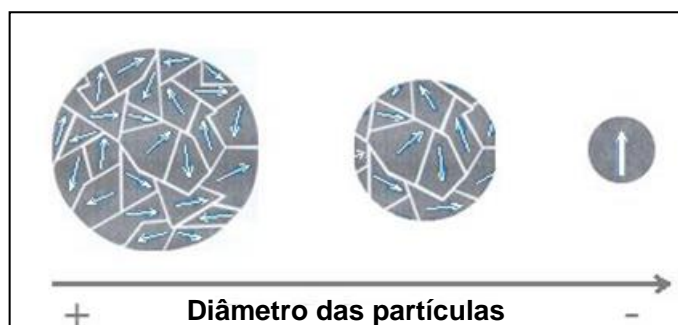


Figura 6 – Variação do número de domínios em relação ao diâmetro das partículas. (Adaptada de: Hunter⁵⁵).

Nanopartículas superparamagnéticas exibem uma alta susceptibilidade magnética, mas na ausência de um campo magnético não exibem magnetização espontânea. Isto se deve ao fato de que, nessas condições, as flutuações dos momentos magnéticos são suficientemente intensas para orientar aleatoriamente os momentos magnéticos individuais de cada partícula, levando a uma magnetização global nula.⁵⁸

No entanto, a versatilidade das NPMs como ferramenta na área da biotecnologia surge não somente das suas propriedades superparamagnéticas⁵⁹, mas também com a possibilidade de recobrimento de sua superfície, gerando um sistema do tipo núcleo/coroa.⁵⁸ O recobrimento pode ser lipossomas, oligossacarídeos cíclicos, peptídeos ou polímeros, que aumentam a sua estabilidade em meio biológico.⁶⁰

Atualmente, amplo destaque tem sido dado a NPMs recobertas com polímeros por meio da técnica de deposição camada a camada (*Layer-by-Layer* - LbL), que permite a criação de multicamadas após diversas interações eletrostáticas entre o polímero e as NPMs,⁶¹ conforme mostrado na Figura 7.

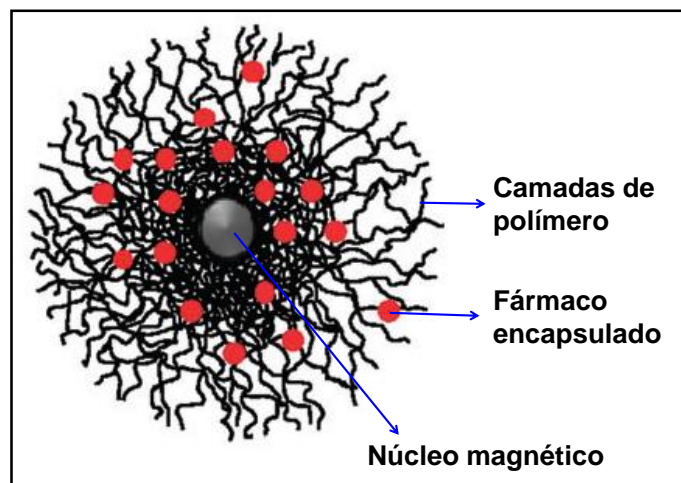


Figura 7 – Representação de NPMs revestidas com polímeros pH e termoresponsivo, carregadas com um fármaco hidrofóbico. (Adaptada de: Colombo et al.⁶¹).

A inserção das NPMs em sistemas poliméricos constitui uma alternativa para a vetorização e o controle da liberação de fármacos.⁶² Por conseguinte, polímeros, como a quitosana e o alginato de sódio podem formar com as NPMs um nanossistema polimérico-magnético biocompatível, pH e termoresponsivo, com degradação controlada por hipertermia magnética e, assim, ter uma modulação externa na liberação assistida e controlada do fármaco em uma região específica do organismo.⁶³

Seth et al.⁶⁴ criaram um nanossistema baseado em um núcleo magnético revestido com camadas de quitosana-alginato para administração oral de pequenas moléculas, a fim de aumentar a sua biodisponibilidade. O nanossistema exibiu um comportamento superparamagnético, adequado para administração oral e alta resistência em meios ácidos (pH do estômago). Finotelli et al.⁶⁵, investigaram o potencial das partículas de alginato-quitosana contendo NPMs como sistema de liberação controlada de insulina. Segundo os autores, a associação de quitosana e alginato de sódio reforçou a estrutura das esferas e aumentou sua impermeabilidade, possibilitando a liberação controlada do agente ativo pesquisado. Em relação à adição das NPMs, esta promoveu uma liberação mais intensa e controlada do fármaco quando o campo magnético externo foi aplicado. Lu e Liu⁶⁶, prepararam com sucesso dois tipos de sistemas para liberação de ibuprofeno; o primeiro consistiu em nanopartícula magnéticas-alginato IBU(AL/IBU/Fe₃O₄) preparadas por meio da técnica de coprecipitação e o segundo baseado em nanopartículas de magnetita

superparamagnéticas de alginato contendo ibuprofeno revestidas com multicamadas de quitosana e carboximetil quitosana IBU((AL/IBU/Fe₃O₄)@(CS-CMCS)₃) por meio da técnica de deposição camada a camada. Ambos os sistemas exibiram características de liberação controlada sensíveis ao pH. *Liu et al.*⁶⁷, prepararam nanoesferas magnéticas revestidas com alginato/quitosana, para imobilização de Lipase de *Candida rugosa* por diferentes métodos. As nanoesferas apresentaram comportamento superparamagnético e alta resistência ao pH e à temperatura, indicando boa estabilidade.

2.3. Quitosana

A quitosana (Figura 8) é um polímero natural obtido a partir da reação de *N*-desacetilação da quitina em meio alcalino.⁶⁸ É representada como um copolímero de 2-amina-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1,4).⁶⁹

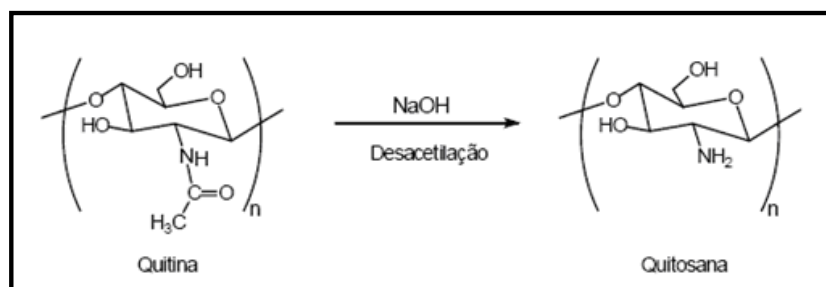


Figura 8 – Conversão da quitina em quitosana via reação de desacetilação. (*Agarwal et al.*⁶⁸).

Este polímero pode variar em grau de desacetilação (GD) de 50 a 95%, dependendo da fonte e do método de preparação.⁷⁰ Apresenta pKa dos grupos amina, variando entre 6,2 e 7,2, o qual é influenciado pelo GD e pela densidade de carga. É solúvel em meios aquosos ácidos, de pH < 6,2 e, quando dissolvida possui carga positiva sobre os grupos -NH₂, o que facilita sua solvatação em água. Além disso, adere a superfícies carregadas negativamente, agregando-se com compostos polianiónicos.⁷¹

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois tem grupos amina e hidroxila reativos capazes de serem submetidos à

modificação química.⁷² Combina propriedades como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade.⁷³ Desta forma, tanto a solubilidade em soluções aquosas ácidas, quanto suas propriedades atribuem a quitosana potencial para diversas aplicações.

Ao longo das últimas décadas, a quitosana tem sido extensivamente pesquisada devido ao seu potencial para diversas aplicações, como, por exemplo, na biomedicina, indústria alimentícia e de cosméticos, agricultura, tratamento de água, engenharia de tecidos e sistema de liberação controlada de fármacos, entre outras.⁷⁴

Como sistema de liberação controlada de fármacos, a quitosana tem sido bastante utilizada na forma de micro/nanopartículas.⁷⁵ No entanto, seu uso como revestimento de NPMs tem atraído à atenção de inúmeros pesquisadores, pois apresenta em sua estrutura grupos funcionais que interagem facilmente até mesmo com fármaco hidrofóbicos. Dessa maneira, o polímero garante maior estabilidade as NPMs, minimiza sua toxicidade e proporciona rotas versáteis de administração do fármaco.⁷⁶

2.4. Alginato de sódio

O alginato de sódio (Figura 9) é um polissacarídeo não ramificado natural, extraído de algas marinhas pardas e algumas bactérias, formado por dois tipos de ácido poliurônico: o ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) unidos por ligações (1 \rightarrow 4)-glicosídicas, de composição e sequência variada. Estes monômeros são epímeros com orientações diferentes na cadeia polimérica, porém somente a unidade G é a responsável por permitir a ligação iônica cruzada.⁷⁷

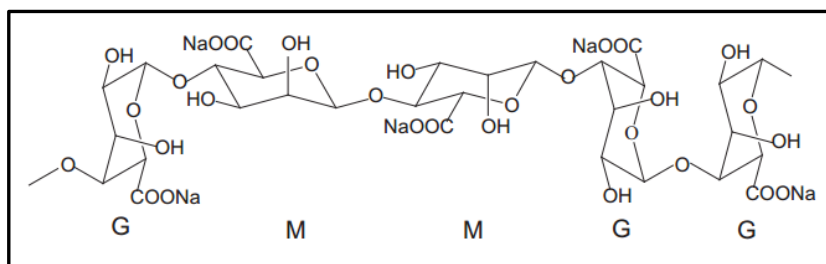


Figura 9 – Estrutura química do alginato de sódio. (Yang et al.⁷⁷).

Os valores de pKa das unidades ácido manurônico e ácido gulurônico do alginato é de 3,38 e 3,65, respectivamente. Possui massa molar em torno de 32.000 e 400.000 g/mol, é quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0, hidrofílico, porém insolúvel em solventes orgânicos. Sua solubilidade é diretamente influenciada pelo pH do meio. Assim, quando o pH é inferior ao pKa do alginato ocorre a formação do ácido algínico, que é insolúvel em água. Quando o valor do pH se encontra acima do valor do pKa, o alginato torna-se carregado negativamente, formando complexos com polímeros catiônicos.^{78,79}

Os monômeros “G” e “M” são arranjados em estrutura de blocos, sendo que sua composição e distribuição variam com a fonte do alginato, estações do ano, momento da colheita, parte da alga em que foi retirado e condições de crescimento. A composição dos resíduos das unidades “M” e “G”, a extensão da sua sequência e a massa molar determinam as características físico-químicas do alginato. Assim, a viscosidade varia proporcionalmente com o teor de resíduos “G”, com a massa molar do polímero e com o pH do meio. Alguns estudos demonstram que a viscosidade aumenta à medida que o pH do meio diminui, e quanto maior o teor de resíduos “G”, maior será a rigidez do gel formado.⁸⁰

Contudo, teores altos de resíduos “G” resultam em partículas com grande granulometria e elevada polidispersão e em géis com alta porosidade. Já nos sistemas com elevado teor de “M”, observa-se a produção de géis mais fracos, elásticos e mais estáveis ao congelamento/descongelamento. Desta forma, o alginato tem sido utilizado em conjunto com outro polímero, a fim de melhorar as suas propriedades.⁸¹

Muitos pesquisadores têm demonstrado grande interesse no uso do alginato de sódio, como sistema de liberação controlada de fármacos, principalmente, por ser um polímero versátil, biocompatível, hidrofílico, biodegradável em condições fisiológicas normais, ter um custo relativamente baixo, além de possuir propriedades de bioadesão, baixa toxicidade e formar complexos polieletrólíticos (PEC) com polications⁸², conforme mostrado na Figura 10.

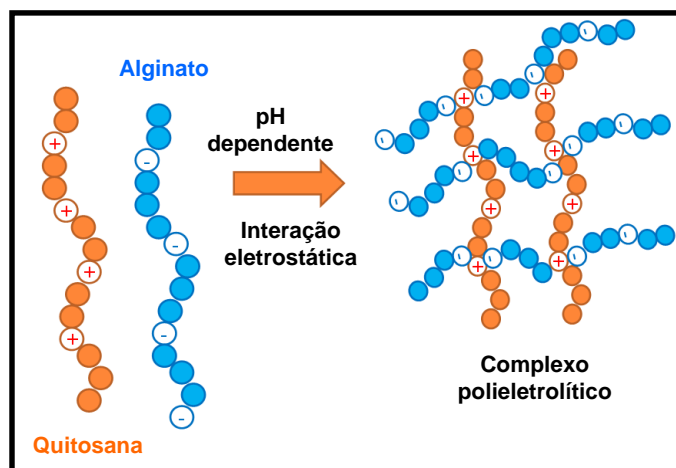


Figura 10 – Formação de complexo polieletrólítico entre quitosana e alginato.

Complexos polieletrólíticos formados entre alginato de sódio e quitosana são biodegradáveis, biocompatíveis e mecanicamente fortes em baixos valores de pH, em que a quitosana é solúvel, assim, a fácil dispersibilidade da quitosana em meio ácido é prevenida pela presença do alginato, que é insolúvel em condições ácidas.⁸³ Além disso, enquanto a quitosana é facilmente degradada pelas lisozimas, o complexo QTS-ALG demonstra maior resistência devido à forte interação entre as cadeias poliméricas, tornando, desta forma, uma excelente estratégia para aplicação como sistema de liberação controlada e direcionada de fármacos, tanto na forma de micro/nanopartículas como na funcionalização de NPMs.⁶⁰

2.5. Liberação controlada e direcionada de fármacos

A liberação controlada e sítio-direcionada de fármacos vêm sendo bastante estudada, principalmente na terapia oncológica por se tratar de uma técnica menos agressiva que os métodos de liberação convencionais.⁸⁴ Neste tipo de sistema é possível controlar a dosagem, o tempo entre as liberações de fármaco, a sobrecarga no organismo com doses excessivas e a ação dos medicamentos em células ou tecidos saudáveis.⁸⁵ A Figura 11 estabelece uma comparação entre o sistema convencional e o sistema de liberação controlada.

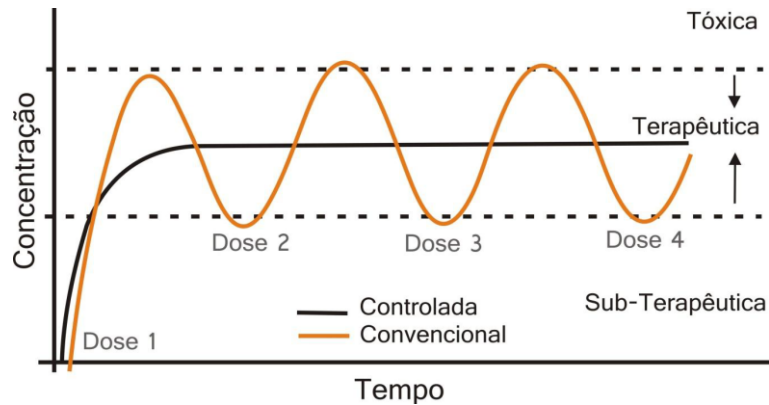


Figura 11 – Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo. (Akbarzade et al. ⁸⁴).

A liberação controlada implica a associação química ou física dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que têm a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação do fármaco, a partir desse mesmo sistema e conduzir o fármaco até ao sítio específico, em que este deve atuar.⁸⁶

Os sistemas de liberação de fármacos constituídos de polímeros estão despertando a atenção de pesquisadores, já que este material permite uma liberação lenta e gradual da substância ativa.⁸⁷ No entanto, a liberação do fármaco encapsulado dependerá do tipo de geometria da partícula e do agente encapsulante utilizado. Esses fatores ditam o mecanismo de liberação, o qual pode ocorrer por intumescimento, difusão, degradação, relaxação e efeitos de solvente.⁸⁸

Na prática, matrizes poliméricas geralmente liberam o soluto via combinação de vários mecanismos. Sendo assim, o pH do meio, o estresse mecânico, a temperatura, a atividade enzimática, o tempo e a força osmótica são fatores que podem servir de estímulo para que ocorra a liberação do fármaco.⁸⁹

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, muitos esforços têm sido realizados a fim de elucidar o modelo de transporte do fármaco e revelar quais os mecanismos de liberação do fármaco a partir dos sistemas poliméricos de liberação.⁹⁰

O primeiro modelo proposto por *Varelas et al.*⁹¹ foi designado por cinética de ordem zero, que baseia-se na liberação lenta da substância ativa a

partir de formas farmacêuticas que não se desagregam. Este modelo é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada, como é o caso dos comprimidos matriciais, dos sistemas osmóticos e das formas revestidas. Na maioria das vezes, a quantidade inicial do fármaco liberado resulta de uma liberação imediata, motivada ou pela liberação do fármaco existente na superfície do sistema matricial seguido de uma liberação mais lenta.

A cinética de liberação de primeira ordem proposto por *Ritger-Peppas*⁹² tem sido bastante utilizada para explicar o perfil de liberação a partir de vários tipos de sistemas. O modelo é descrito pela Equação 1 e sugere que a taxa de liberação do fármaco é constante durante o período de tempo.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 100 - e^{-b-kt} \quad \text{(Equação 1)}$$

A Equação 1 é uma equação de uma linha reta, em que M_t/M_∞ representa a fração do soluto liberado no tempo t , o parâmetro b é obtido a partir do declive da reta e a constante de liberação k pode ser obtida a partir da inclinação da linha.

*Higuchi*⁹³ descreveu o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, que depende da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas desse tipo podem ser erodíveis, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco.

Outro modelo baseia-se na equação semi-empírica (Equação 2) proposta por *Korsmeyer-Peppas*⁹⁴. Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano), controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Além do que, a equação é justificada dentro da liberação cumulativa <60 %.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad \text{(Equação 2)}$$

Em que M_t/M_∞ representa a fração do soluto liberado no tempo t , k é uma constante que incorpora características da matriz polimérica e do soluto e n é o expoente difusional, que de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. Na Tabela 1 estão listados os possíveis valores de n .

Tabela 1 – Relação entre o expoente difusional n e mecanismo de liberação para os diferentes sistemas de liberação controlada.

Expoente difusional, n			Mecanismo de liberação
Filmes	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo (não Fickiano)
1,0	0,89	0,85	Caso II de transporte
$> 1,0$	$> 0,89$	$> 0,85$	Super Caso II de transporte

(Siepmann et al.⁹⁸).

Considerando-se os critérios para cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor de coeficiente difusional $n \leq 0,43$, indica que o mecanismo de liberação é o de difusão do soluto por meio das camadas da matriz, também conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou “Caso I”. Quando o coeficiente encontrado está entre $0,43 < n < 0,85$, o transporte não-Fickiano ou anômalo prevalece. Nesse caso ocorre a superposição dos dois fenômenos, sendo a liberação controlada por difusão e intumescimento, simultaneamente. Um valor de n igual a 0,85 indica que a liberação do soluto ocorre somente pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, ou seja, independente do tempo. Este mecanismo também é conhecido como “Caso II” de transporte. Para valores de $n > 0,85$ têm-se um Super Caso II de transporte, no qual há uma contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica⁹⁴.

Os modelos de ordem zero e o modelo de Higuchi são mutuamente exclusivos: quando se aplica um, o outro já não tem aplicação. O mesmo não sucede com o modelo de Korsmeyer–Peppas, sendo sua a aplicação bastante

útil para complementar as informações relativamente aos mecanismos de liberação dos fármacos obtidas com a aplicação dos outros dois modelos⁹⁵.

O modelo matemático descrito por *Gallagher-Corrigan*⁹⁶ propõe que a liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos ocorra em um processo de dois estágios. Inicialmente ocorre uma rápida liberação devido à dissolução de moléculas do fármaco presentes na superfície, em seguida ocorre uma liberação mais lenta devido à degradação da matriz polimérica. O modelo é descrito pela fórmula dada pela Equação 3.

$$f_t = f_B(1 - e^{-k_1 t}) + (1 - f_B) \left[\frac{e^{k_2 t - k_2 t_m}}{1 + e^{k_2 t - k_2 t_m}} \right] \quad \text{(Equação 3)}$$

Na qual f_t é a fração do fármaco liberado no tempo t , f_B é a fração máxima do fármaco liberado, k_1 é a constante de liberação no primeiro estágio, t_m é o tempo máximo para a liberação e k_2 é a constante de liberação durante o estágio de degradação do polímero.

Além do uso de sistemas poliméricos de liberação, muitos estudos têm reportado que as NPMs apresentam um elevado potencial enquanto veículo de transporte de agentes citotóxicos, pois são capazes de circular pela corrente sanguínea sem escapar das paredes dos respectivos vasos, devido ao seu reduzido diâmetro.⁹⁷⁻⁹⁹

Em aplicações como carreadores de fármacos, as NPMs são, geralmente, revestidas com material orgânico ou inorgânico, que funciona como suporte do fármaco. Logo, o sistema básico para liberação magneticamente direcionado de fármacos consiste em um núcleo magnético revestido por um material biocompatível, no qual a substância ativa pode estar ligado à superfície do revestimento por meio dos seus grupos funcionais ou ainda imobilizado no interior dos poros do material¹⁰⁰, conforme apresentado na Figura 12.

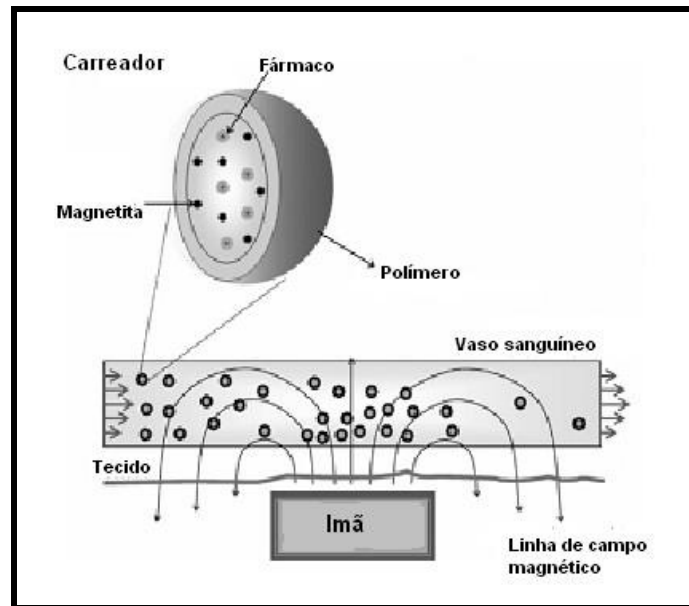


Figura 12 – Sistema nanocarreador polimérico-magnético de fármacos. (Yang et al.¹⁰¹).

O núcleo magnético, em geral, é um óxido de ferro em que a carga e o caráter hidrofóbico/hidrofílico da superfície influencia significativamente na distribuição *in vivo* das NPMs em cada tecido do organismo e na associação destas com biomoléculas do fluido biológico.¹⁰¹ Assim, na funcionalização das NPMs, o material utilizado deve recobrir suficientemente a superfície do óxido de ferro, a fim de prevenir interações dos metais superficiais com o meio biológico, bem como permitir a conjugação com fármacos.¹⁰²

Além disto, as NPMs podem ser submetidas à ação de um campo magnético, no processo de hipertermia magnética, gerando calor pela transformação de energia magnética em energia térmica, resultando no aumento da temperatura local a uma faixa de 41 a 43°C.¹⁰³

Desta forma, no processo de liberação de fármacos associados ao sistema polimérico-magnético, por exemplo, o aquecimento favorece a formação de rupturas na estrutura do polímero, permitindo o controle da liberação e o direcionamento do fármaco.¹⁰⁴ Os principais mecanismos para geração de aquecimento na hipertermia magnética¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ são:

- a) Geração de correntes parasitas (*eddy currents*) em um material de baixa resistividade elétrica exposta ao campo magnético alternativo. A perda de energia manifestada sob a forma de calor devido às correntes parasitárias (*ED*) é dada pela Equação 4.

$$ED = \frac{(\mu \cdot \pi \cdot d \cdot f \cdot H)^2}{20\rho} \quad \text{(Equação 4)}$$

Em que μ é a permeabilidade do material, d é o diâmetro da partícula, f é a frequência, H é o campo magnético e ρ é a resistividade do material. Neste mecanismo o aquecimento induzido pelas correntes parasitas em partículas de diâmetro pequeno é negligenciado.

- b) Reversão da magnetização dentro de um material magnético, ou seja, a rotação do momento dentro da partícula (relaxamento de Néel).
- c) Rotação do material magnético em relação ao eixo do campo aplicado quando está em um meio líquido (relaxamento Browniano).
- d) Processo de magnetização e desmagnetização devido ao alinhamento dos domínios em relação ao campo magnético aplicado externamente. Para que essa alienação de domínios ocorra, a primeira desmagnetização ocorre quando o campo externo muda de direção, seguido de uma magnetização em uma nova direção, esta transição causa perdas de energia conhecidas como perdas de histerese. A quantidade de calor gerada por unidade de volume é dada pela frequência multiplicada pela área do ciclo de histerese (Equação 5).

$$P_F = \mu_0 f \oint H dm \quad \text{(Equação 5)}$$

A quantidade de calor gerada pelas nanopartículas magnéticas pode ser determinada pelo momento magnético, pelo campo, pela frequência e pelo volume de partículas. A geração de calor de nanopartículas (P), pode-se expressar conforme descrito na Equação 6.

$$P = \mu_0 \pi \cdot f x'' |H|^2 \quad \text{(Equação 6)}$$

Na qual x'' é a susceptibilidade, H é a amplitude da Intensidade do campo magnético e $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} (\text{TmA})^{-1}$.

O efeito vibratório que ocorre com as NPMs, quando submetidas a um campo magnético externo, promove a difusão do fármaco para o meio,

podendo ser de forma lenta ou mais acelerada (Figura 13). Dependendo da intensidade do campo magnético, pode haver um aquecimento do sistema polimérico-magnético, fazendo com que o polímero reaja de forma diferente ao liberar o fármaco.¹⁰⁹ Em se tratando de um polímero hidrofílico, o sistema, em geral, possui mais de 90 % de água em sua estrutura. Logo, quando há uma agitação magnética suave, a água é liberada juntamente com o fármaco, resultando em uma retração do polímero. Em contrapartida, se houver uma agitação magnética intensa, a vibração promoverá um aquecimento local, alterando a estrutura conformacional do polimérico, ocasionando, em alguns casos, o seu rompimento.¹⁰⁹⁻¹¹⁰

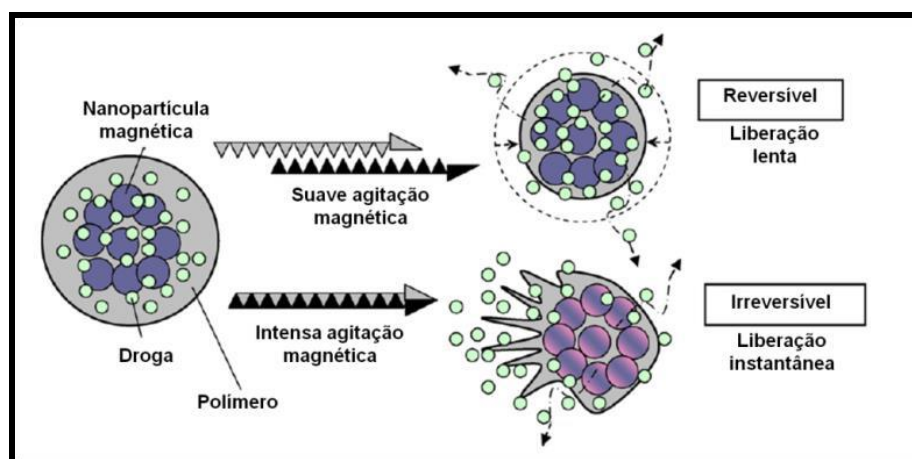


Figura 13 – Resposta térmica do nanossistema polimérico-magnético em relação ao campo magnético aplicado. (Adaptada de Liu et al.¹¹⁰).

Carregadores magnéticos foram utilizados, pela primeira vez, na liberação do fármaco citotóxico (doxorrubicina) em tumores sarcoma implantados em ratos, mostrando remissão total dos sarcomas quando comparados com a não remissão em outro grupo de ratos, nos quais foram administradas dez vezes a dose, mas sem o direcionamento por carreador magnético.¹¹¹ Desde o sucesso desse primeiro estudo, inúmeros são os relatos sobre a utilização de NPMs na liberação controlada e direcionada de fármacos e como mediadoras no aquecimento e lise de células tumorais, minimizando danos aos tecidos saudáveis.

*Bajpai e Gupta*¹¹², projetaram um nanocompósito magnético para a liberação da Ciprofloxacina através da orientação promovida por um campo magnético externo. Isso possibilitou a análise da integridade química do

fármaco e dinâmica do processo de liberação do mesmo, tornando essa aplicação mais eficaz e reduzindo os efeitos colaterais.

*Anwar et al.*¹¹³, estudaram as características e a localização *in vitro* em um tubo capilar de nanopartículas de óxido de ferro, com a finalidade de serem utilizadas como sistema de liberação da curcumina. As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, utilizando-se o ácido oleico como surfactante, mostrando-se adequadas para serem utilizadas como sistema de liberação de fármacos.

*Chalkidou et al.*¹¹⁴, avaliaram a eficiência de aquecimento de nanopartículas de Fe/MgO biocompatíveis e sua aplicação *in vitro* em hipertermia magnética, utilizando diferentes culturas de células tumorais humana de mama. Os experimentos revelaram que as nanopartículas apresentaram um bom perfil citotóxico, eficiência de absorção significativa, com alta taxa de absorção, resposta térmica rápida e duração mínima no tratamento. A partir dessas características, os autores concluíram que as nanopartículas são adequadas para aplicação *in vitro* em hipertermia magnética.

Em outro estudo, realizado por *Zamora-Mora et al.*¹¹⁵, demonstraram que NPMs recobertas com quitosana e tripolifosfato de sódio apresentam características adequadas para utilização em hipertermia magnética. Os autores também avaliaram o efeito da hipertermia por meio da medida da taxa específica de absorção e a citotoxicidade das nanopartículas foi analisada, utilizando-se uma cultura de célula de fibroblastos humana, empregando o ensaio de Azul de Alamar. As nanopartículas estudadas apresentaram biocompatibilidade e habilidade para aquecer quando submetidas a um campo magnético alternado.

Estudos realizados por *Wang et al.*¹¹⁶ e *Liu et al.*¹¹⁷, também revelaram a eficiência de NPMs funcionalizadas com quitosana e alginato de sódio, aplicadas como sistema de liberação de fármacos. Em ambos os estudos, os autores verificaram que o sistema polimérico-magnético responde de forma rápida à aplicação do campo magnético e que os polímeros são sensíveis ao pH e à temperatura, permitindo a liberação controlada e direcionada de fármacos.

CAPÍTULO III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os reagentes utilizados nos experimentos foram: Quitosana (99% de pureza – com massa molar média – 190000 g/mol – Sigma-Aldrich), alginato de sódio (99% de pureza – Sigma-Aldrich), Curcumina (95% de pureza) foi obtida da *Curcuma Longa L*, com grau de pureza de 98% – Sigma-Aldrich. Os demais reagentes são de grau analítico e foram usados sem nenhuma purificação prévia. Para o teste biológico utilizou-se: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) obtidos da Life Technologies (USA) e a linhagem de célula tumoral humana de mama (MCF-7) foi adquirida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil.

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese das nanopartículas magnéticas

A Síntese das NPMs de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) foi realizada por meio da técnica de decomposição térmica, conforme adaptações da metodologia descrita por *Kim et al.*¹¹⁸. Na síntese típica, Figura 14, uma mistura de 2,0 mmols de acetilacetonato de Ferro(III), 1,0 mmol de acetilacetonato de manganês(II), 15 mL de éter benzílico e 15 mL de oleilamina foi mantida sob agitação magnética e aquecida à 110°C durante 1h para remover a água. Posteriormente, o sistema foi mantido sob refluxo durante 4 h, à 300°C em atmosfera de nitrogênio. Após o resfriamento do sistema, as NPMs foram lavadas por cinco vezes com etanol e recobertas com moléculas de citrato, por um processo de troca de ligante. Para isso, as NPMs lavadas foram dispersas em um sistema bifásico, contendo 10 mL de hexano e 10 mL de solução de ácido cítrico (100 mg/mL em DMSO) em um balão cônico. O sistema foi sonicado durante 30 min e movido por um agitador com rotação vertical durante 24h. Após a centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol (o qual foi evaporado) e as NPMs foram redispersas em água, ajustando o seu pH para 7,2 com o auxílio de solução de citrato de sódio (100 mg/mL). As NPMs com citrato foram rotuladas como MC0.

A partir do ponto de intersecção, dos segmentos lineares da curva de condutividade iônica antes e depois do ponto de equivalência, determinou-se graficamente, o volume em mL de titulante necessário para protonar os grupos amina da QTS e os grupos carboxílicos do ALG. Multiplicando-se o volume de titulante por sua concentração e pela massa inicial de cada polímero, obteve-se a densidade de carga superficial em mmol/g. Ao relacionar o volume do titulante à curva de pH obteve-se o pKa de cada polieletrólito, segundo a equação de *Henderson-Hasselbalch* ($pK_a = pH + \log \frac{(1-\alpha_0)}{\alpha_0}$).

Para a amostra MC0, a densidade de carga e o pKa foram determinados seguindo o modelo de $1-pKa$ ¹¹⁹, em que pKa é a constante termodinâmica relativa ao equilíbrio e depende, fundamentalmente, da natureza da superfície das partículas ($pKa = -\log Ka$). Assim, a partir da equação de *Henderson-Hasselbalch* e das curvas de titulação, pôde-se calcular o valor de pKa relativo ao equilíbrio de transferência de prótons. Já a densidade de carga superficial (σ_0) resulta de um complexo mecanismo de transferência de prótons entre a superfície e o seio da dispersão e foi calculada, considerando a Equação 7:

$$\sigma_0(pH) = \frac{FV}{A} \left[\frac{10^{-pKa}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \right] CT \quad \text{(Equação 7)}$$

Em que **F** é a constante de *Faraday*, **V** é o volume da dispersão, **A** é a área total das nanopartículas e **CT** é a concentração total dos sítios superficiais. Desta forma, foi possível expressar o valor de saturação da densidade superficial de carga.

Com base nos valores de pKa obtidos nas titulações potenciométricas e condutimétricas foi possível construir o diagrama de especiação das frações molares dos sítios superficiais em função do pH, estabelecendo, desta forma, o pH ideal para a interação entre as espécies químicas provenientes dos polímeros e da amostra MC0.

3.2.4. Avaliação da interação entre os polímeros

A interação eletrostática entre as multicamadas dos polímeros foi quantitativamente monitorada, utilizando-se uma microbalança de cristal de quartzo (QCM-D, Q-Sense E4, Göteborg, Suécia). Para isto, soluções (1,0 mg/mL) de QTS, ALG e QTS-Curc em pH 5.0 foram depositadas na superfície de cristais de quartzo revestido com Au (50 nm) (QSX-301, Q-Sense) (5 MHz). Os cristais de QCM-D foram previamente limpos em UV-Ozônio e as soluções de polímero, injetadas nas células de reação, foram previamente filtradas, utilizando-se microfiltros de membrana com diâmetro de 22 nm e borbulhadas com nitrogênio durante 30 min. O aumento de massa depositada foi calculada de acordo com a alteração da frequência de ressonância, utilizando-se o modelo de *Sauerbrey*¹²¹, com o programa QTools[®], conforme Equação 8:

$$\Delta m = -\frac{C\Delta f}{n} \quad \text{(Equação 8)}$$

Em que Δf é a *variação na frequência*, Δm e a *variação na massa*, n o número de overtone e C é a constante de sensibilidade de massa (18 ng,cm⁻².Hz¹).

3.2.5. Funcionalização da amostra MC0 e encapsulação da curcumina

A funcionalização das NPMs de MC0 foi realizada por meio da técnica de deposição LbL, que consiste na deposição de multicamadas de polímeros sobre a superfície das NPMs. Assim, foram produzidas duas séries de amostras, sendo uma modificada apenas com polímeros (denominadas amostras brancas) e a outra com polímeros e curcumina (denominadas amostras contendo curcumina), conforme detalhado na Figura 15 e Tabela 2.

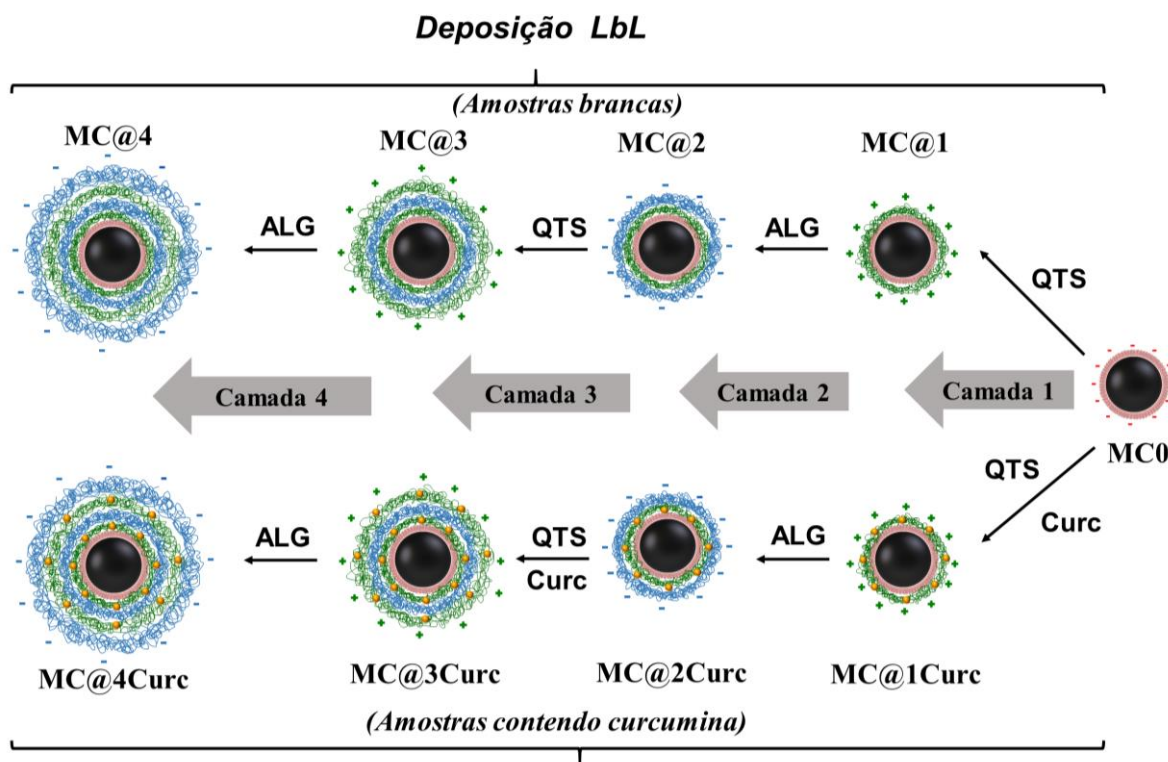


Figura 15 – Esquema ilustrativo da obtenção de amostras brancas e contendo curcumina por meio da técnica de deposição camada a camada.

Tabela 2 - Resumo das condições utilizadas para produzir as amostras brancas e contendo curcumina.

Amostra	Substrato ¹	Solução de polímeros ¹	Curcumina ²
MC0	-	-	-
MC@1	MC0 (200 mL)	QTS (200 mL)	-
MC@2	MC@1 (150 mL)	ALG (150 mL)	-
MC@3	MC@2 (100 mL)	QTS (100 mL)	-
MC@4	MC@3 (50 mL)	ALG (50 mL)	-
MC@1Curc	MC0 (200 mL)	QTS (200 mL)	30 mg
MC@2Curc	MC@1Curc (150 mL)	ALG (150 mL)	-
MC@3Curc	MC@2Curc (100 mL)	QTS (100 mL)	30 mg
MC@4Curc	MC@3Curc (50 mL)	ALG (50 mL)	-

¹As concentrações das soluções de substrato e de polímeros foram de 1,0 mg/mL; ²A curcumina foi dissolvida na solução de QTS.

Na série de amostras brancas, para deposição da primeira camada (amostra MC@1) foram adicionados 200 mL de solução QTS (1,0 mg/mL) a 200 mL de uma dispersão aquosa de MC0 (1,0 mg/mL). Para deposição da segunda camada (amostra MC@2) foram adicionados 150 mL de solução de ALG (1,0 mg/mL) a 150 mL de uma dispersão aquosa contendo 150 mg de MC@1 obtido anteriormente. Para a terceira camada (amostra MC@3) foram

adicionados 100 mL de QTS (1,0 mg/mL) a 100 mg de MC@2 dispersos em 100 mL de água. Finalmente, para a quarta camada (MC@4), 50 mL de ALG (1,0 mg/mL) foram misturados com 50 mL de uma dispersão contendo 50 mg de MC@3. Na obtenção de todas as amostras, as soluções dos polímeros foram introduzidas em suspensões, usando uma bomba peristáltica com velocidade de gotejamento de 20 mL/min, sob agitação constante, utilizando um dispositivo ultra dispersor a 9000 rpm durante 10 min. Posteriormente, os precipitados foram decantados magneticamente e lavados três vezes com água tipo 1 para remover o excesso de polímeros não adsorvidos no substrato de NPMs. Além disso, antes da funcionalização com os polímeros, o pH de todas as soluções foi ajustado para ~5,0 com solução 0,1 mol/L de NaOH ou HCl.

As amostras contendo curcumina foram preparadas utilizando o mesmo procedimento descrito para as amostras brancas, porém nesta série de amostras foi utilizado uma solução de QTS a pH 5,0 contendo 30 mg de curcumina durante a produção das camadas 1 e 3. As amostras contendo curcumina foram rotuladas como MC@1Curc, MC@2Curc, MC@3Curc e MC@4Curc, referindo-se às camadas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Após a lavagem três vezes com água tipo 1 as amostras brancas e contendo curcumina foram secas à temperatura ambiente em um dessecador sob vácuo durante 24 h.

3.2.6. Métodos de caracterização

3.2.6.1. Determinação da fração volumétrica das NPMs (ϕ)

A fração volumétrica da amostra MC0 foi determinada medindo-se a massa de 1,0 mL das NPMs em um frasco previamente pesado. Após secagem das NPMs em dessecador por 24 h, essas foram novamente pesadas e as massas das NPMs secas e líquidas foram calculadas, considerando-se a massa do frasco onde estavam contidas. A partir disso, a fração volumétrica em termos percentuais foi obtida, conforme a Equação 9:

$$\phi = \frac{MP}{V} \cdot d^{-1} \cdot 100\% \quad \text{(Equação 9)}$$

Em que ϕ é a fração volumétrica, MP é a massa das NPMs secas, V é o volume das NPMs (1,0 mL) e d é a densidade teórica da ferrita de manganês (5,0 g/mL). O procedimento para o cálculo da fração volumétrica foi realizado em triplicata.

3.2.6.2. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

O grau de desacetilação em porcentagem (%GD) da quitosana foi determinado por meio de titulação condutimétrica, adaptando-se a metodologia descrita por *Alvarenga*¹²². Para isso, 200 mg de quitosana foram dissolvidos em 40 mL de solução 0,054 mol/L de HCl. A titulação foi conduzida, utilizando-se solução 0,165 mol/L de NaOH como titulante até o volume final de 25 mL, com adições de 0,5 mL a cada intervalo de 20 s. A titulação condutimétrica foi realizada em triplicata e a porcentagem de grupos amina foi calculada de acordo com a Equação 10:

$$\% GD = \frac{C(V_2 - V_1)161}{M} \times 100 \quad \text{(Equação 10)}$$

Em que C é a concentração da solução de NaOH, V_1 e V_2 são os volumes de NaOH em mL empregados para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada, 161 é a massa de uma unidade monomérica de quitosana e M é a massa do polímero em miligramas utilizada na titulação.

3.2.6.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das amostras desenvolvidas neste estudo foram determinados, utilizando-se um equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments. As medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente e utilizando-se uma solução diluída (0,01 wt %) das amostras em água tipo 1.

3.2.6.4. Difração de Raios X (DRX)

Para a análise de DRX, a amostra MC0 foi deixada em dessecador por aproximadamente 24 h sem prévia diluição para sua secagem. O pó obtido foi triturado e finamente pulverizado com auxílio de um gral de ágata e prensado em um porta-amostra de vidro, que foi analisado em um difratômetro Miniflex 600, Rigaku, com detecção rápida DTex, operando a 40 kV e 30 mA e radiação Cu-K α , selecionada com um monocromador de grafite. As condições de varredura foram 15 a 80°, com um passo de 0,02° e velocidade de 5°/min. Os dados foram tratados com o auxílio do programa Origin[®].

3.2.6.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET da amostra MC0 e das amostras brancas e contendo curcumina, foi realizada, utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEOL JEM-2100, equipado com EDS, *Thermo scientific*. Do efeito, as suspensões coloidais foram dispersas em água tipo 1 e sonicadas por 10 min. Após uma alíquota de 5,0 μ L foi depositada sobre uma tela de cobre com 400 *mesh*, recoberta por um filme de carbono e secas à temperatura ambiente, por 24 h. O histograma com a distribuição de tamanho foi construído a partir da contagem de cerca de 300 partículas e tratadas com o auxílio do programa ImageJ[®].

3.2.6.6. Análise porosimétrica e da área superficial por Brunauer–Emmett–Teller (BET)

A determinação da área superficial e distribuição do volume dos poros das amostras desenvolvidas neste trabalho foram realizadas a 77K, em um equipamento AUTOSORB-1, com os seguintes parâmetros para análise: massa da amostra por volta de 0,2 g, espaço livre quente próximo de 16 cm³, espaço livre frio por volta de 48 cm³, intervalo de equilíbrio de 10 s e nenhuma dose de baixa pressão e degasificação automática.

3.2.6.7. Determinação do pKa das NPMs funcionalizadas com polímeros

A determinação do pKa das NPMs funcionalizadas com polímeros foi realizada com base na titulação potenciométrica e condutimétrica simultânea das amostras brancas e contendo curcumina, conforme descrito no item 4.2.2. O intuito desta análise consistiu em avaliar as interações ocorridas nas amostras desenvolvidas por meio das possíveis mudanças nos valores de pKa obtidos, quando comparado aos valores obtidos para a amostra MC0 e para os polímeros, individualmente.

3.2.6.8. Potencial zeta em função do pH

A análise do potencial zeta em função do pH foi realizada em triplicata utilizando uma solução diluída (0,01 wt %) das amostras em água tipo 1, as quais foram submetidas a agitação magnética vigorosa durante o período de análise para evitar a agregação de partículas. Soluções 0,1 mol/L de NaOH e de HCl foram utilizadas para ajuste do pH (2,0 a 12,0) da solução diluída das amostras. Após o ajuste do pH, transferiu-se uma alíquota de 700 µL de cada amostra para uma célula eletroforética, efetuando-se as medidas de potencial zeta no equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments.

3.2.6.9. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Amostras de todas as matérias-primas e das NPMs produzidas neste estudo foram maceradas com KBr seco e limpo, originando pastilhas de KBr e analisadas em um espectrofotômetro FTIR Varian 600. Os espectros de FTIR foram obtidos na região de 4000–400 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e análise média de 32 scans.

3.2.6.10. Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS)

A análise superficial das amostras brancas e contendo curcumina, bem como dos seus respectivos constituintes foi realizada por XPS, utilizando-se um

espectrômetro SPECS SAGE HR 100 *System* com uma fonte de raios-X não monocromática (Mg Ka - linha de 1253,6 eV), operando a 12,5 kV e 250 W. As medições das amostras depositadas em filmes de silício foram realizadas em uma câmara de ultra-alto vácuo (UHV) a uma pressão de $\sim 10^{-6}$ Pa e ângulo fixado em 90°. Os espectros para: C 1s, O 1s, Na 1s, N 1s, Fe 2p e Mn 2p foram adquiridos, empregando a energia de 30 eV e de 15 eV para análise das regiões. Os dados foram analisados no programa CasaXPS 2.3[®], por meio da remoção por satélite e calibração das energias de ligação do pico C 1s a 285 eV. Funções de *Gauss-Lorentz* foram utilizadas para determinar a porcentagem atômica (% at) dos elementos presentes na superfície das amostras e para construir a curva de montagem dos espectros de alta resolução.

3.2.6.11. Análise da composição química

Para a análise da composição química $\sim 5,0$ mg de cada amostra desenvolvida neste estudo foram devidamente digeridas em 1,0 mL de HCl concentrado. Em seguida, uma alíquota de 25,0 μ L foi diluída em 10,0 mL de uma solução 100,0 mg/mL de HNO₃ e analisadas pela introdução direta das amostras no espectrômetro ICP Optima 8000DV, Perkin Elmer, com modo de emissão óptica e radiofrequência de 14000 W. As condições adotadas para a análise foram: fluxo de amostra de 1,5 mL/min, fluxo de plasma de argônio de 10,0 L/min, fluxo de nebulizador de 0,7 L/min e fluxo de gás auxiliar (argônio) de 0,2 L/min.¹²³

3.2.6.12. Análise Termogravimétrica (TGA)

A fim de avaliar a estabilidade térmica das amostras funcionalizadas e de seus respectivos constituintes realizou-se a análise termogravimétrica (TGA), utilizando o equipamento Shimadzu TG 60. A temperatura durante a análise variou de 35°C à 600°C, com razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio a 50 mL/min.

3.2.6.13. Medidas de magnetização

Para as medidas de magnetização procedeu-se a secagem das NPMs desenvolvidas à temperatura ambiente em dessecador durante 24 h, sem prévia diluição. O pó obtido de cada amostra foi triturado e finamente pulverizado com auxílio de um gral de ágata e, em seguida, analisado em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM), em uma faixa de campo magnético de -18 kOe a +18 kOe, à temperatura ambiente.

3.2.7. Caracterização da curcumina

3.2.7.1. Comportamento espectroscópico da curcumina

O comportamento espectroscópico da curcumina em diferentes pHs foi determinado por meio de medidas espectroscópicas de UV-Vis e de fluorescência. As medidas de UV-Vis utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis-U3900H-Hitachi com faixa de varredura de 350-750 nm com um intervalo de dados de 1,0 nm. Já as medidas de fluorescência foram realizadas em um Fluorímetro Fluorolog-TSPC (Horiba-Jovine Ivone), equipado com uma lâmpada de arco 450W-Xenon, fendas de excitação e monocromadores de emissão ajustadas para 5,0 nm, detector de tubo *photomultiplier* (R928P) com uma resolução de 0,2 nm e velocidade de digitalização em torno de 150 nm/s. As amostras foram excitadas a 429 nm e os espectros de emissão registrados na faixa de 440-700 nm. Para a aquisição de ambos os espectros preparou-se uma solução estoque 108 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina em uma mistura 80:20 (v/v) de água:etanol. A partir da solução estoque foi preparada a solução de trabalho na concentração de 6,0 $\mu\text{mol/L}$ por meio da diluição da solução estoque na mistura de água:etanol e, em seguida foi realizado o ajuste do pH de 2,0 a 12,0, com soluções 0,1 mol/L de NaOH e HCl.

3.2.7.2. Curva de calibração da curcumina

As curvas de calibração da curcumina foram obtidas por espectroscopia de fluorescência. Para construção das curvas foram preparadas soluções estoques de 108 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina em uma mistura 80:20 (v/v) de solução

0,1 mol/L de HCl a pH 1,2:etanol e de solução 0,1 mol/L de NaH₂PO₄ a pH 7,4:etanol. O pH das soluções de HCl e de NaH₂PO₄ foi ajustado utilizando-se soluções 0,1 mol/L de NaOH e HCl. A partir das soluções estoques foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações (0,5 a 15 µmol/L) por meio de diluições da solução estoque nas misturas de HCl a pH 1,2:etanol e de NaH₂PO₄ a pH 7,4:etanol. O equipamento e as condições de análise foram os mesmos já descritos no item 3.2.7.1.

3.2.8. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da curcumina

Para a quantificação da curcumina nas amostras funcionalizadas foi desenvolvido e validado um método fluorimétrico rápido, simples e sensível.

3.2.8.1. Equipamento

As análises foram realizadas em Fluorímetro Fluorolog-TSPC (Horiba-Jovine Ivone), conforme condições de análise já descritas no item 3.2.7.1.

3.2.8.2. Validação do método

O processo de validação foi avaliado em relação aos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e limite de detecção, de acordo com as diretrizes regulatórias da ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)¹²⁴ e a resolução da ANVISA RE nº 889¹²⁵. A validade do método foi confirmada por análise de variância (ANOVA), considerando diferença estatisticamente significativa $P < 0,05$.

Especificidade

Para confirmar a especificidade do método, foi visualizada a ausência de interferências causadas pelas amostras brancas, sendo estas analisadas nas mesmas condições experimentais das amostras contendo curcumina.

Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção de três curvas de calibração para a curcumina em três dias diferentes. Para a construção das curvas de calibração, dez concentrações (0,5 a 15 $\mu\text{mol/L}$) de curcumina foram preparadas na mistura 80:20 (v/v) de solução 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 a pH 7,4:etanol.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da contaminação de amostras brancas em suspensão com soluções conhecidas de curcumina, correspondentes às concentrações finais de 0,5; 6,0 e 15,0 $\mu\text{mol/L}$. A recuperação foi determinada como sendo a diferença percentual entre a concentração experimental média (6,0 $\mu\text{mol/L}$) e a concentração teórica em cada nível.

Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), mas expressa como o Desvio Padrão Relativo (DPR). A repetibilidade foi avaliada analisando-se as amostras brancas contaminadas com solução de curcumina, correspondente a concentrações finais de 0,5; 6,0 e 15,0 $\mu\text{mol/L}$, no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. Na precisão intermediária, as análises foram realizadas em três dias diferentes.

Limite de quantificação e de detecção

O limite de quantificação (LQ) corresponde a maior concentração que pode ser determinada quantitativamente com aceitável precisão e exatidão. Já o limite de detecção (LD) corresponde a menor concentração presente na

amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Os LQ e LD foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média de três curvas de calibração.

3.2.8.3. Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação da curcumina encapsulada nas amostras MC@1Curc, MC@2Curc, MC@3Curc e MC@4Curc foi realizada pela técnica de filtração/centrifugação, na qual o ativo livre foi determinado no sobrenadante e o ativo total foi medido após a completa dissolução das nanopartículas.¹²⁶ Para obter o sobrenadante, ~5,0 mg de cada amostra foi dispersa em 1,0 mL de uma mistura 80:20 (v/v) de solução 0,1 mol/L de NaH₂PO₄ a pH 7,4:etanol, centrifugada a 12000 rpm durante 20 min e filtrada em filtro de PTFE de 0,2 µm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma célula de quartzo e analisado em um fluorímetro Fluorolog-TSPC (Horiba-Jovine Ivone) nas condições descritas no item 3.2.7.1. As intensidades relativas de fluorescência foram medidas em $\lambda_{emi} = 540$ nm e comparadas com a curva de calibração do corante na solução 0,1 mol/L de NaH₂PO₄ a pH 7,4:etanol. Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados foram expressos como a quantidade de curcumina (em µg) por mg de nanopartículas. Da mesma forma, a eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada como a relação entre a quantidade de curcumina encapsulada e a quantidade inicial de curcumina utilizada para preparar o lote de nanopartículas.

3.2.9. Estudo de liberação controlada/assistida *in vitro* da curcumina

3.2.9.1. Estímulo de pH e de temperatura

Para o estudo da cinética de liberação *in vitro* de curcumina, ~30 mg das amostras MC@1Curc, MC@2Curc, MC@3Curc e MC@4Curc foram suspensas em 30 mL de solução 0,1 mol/L de HCl a pH 1,2 e de 0,1 mol/L de NaH₂PO₄ a pH 7,4. As amostras foram mantidas sob agitação constante (700 rpm) em banho termostático a três diferentes temperaturas: 25 ± 0,1°C, 37,0 ± 0,1°C e 43 ± 0,1°C. A análise foi realizada durante 240 h por meio de medições

em intervalos de tempo pré-determinados, em que uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante foi analisada em um fluorímetro Fluorolog-TSPC (Horiba-Jovine Ivone), conforme condições descritas no item 3.2.7.1. A quantidade de curcumina liberada foi determinada utilizando as curvas de calibração do corante, que relaciona a intensidade de fluorescência com a concentração conhecida de curcumina ($\mu\text{mol/L}$) nas mesmas soluções em que a cinética de liberação foi conduzida. Os resultados obtidos foram apresentados como porcentagem de liberação de curcumina ao longo do tempo. O mecanismo de liberação foi analisado por meio do ajuste dos perfis da cinética de liberação, aplicando os modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas (Equação 2) e de Gallagher-Corrigan (Equação 3).

3.2.9.2. Estímulo de campo magnético (hipertermia magnética)

O estudo de liberação da curcumina por hipertermia magnética foi realizado em um equipamento da marca Ambrell, modelo Easy Heat LI. Para obtenção das condições ideais para o estudo de liberação, foram traçados os perfis de aquecimento das amostras controles (MC0, polímeros puros e amostras brancas), utilizando campo magnético alternado (CMA) com a frequência de 326 kHz e amplitude de campo magnético alternado (CMA) variando de 50 Oe a 190 Oe, obtidas a partir de medições em sonda de CMA adquirida da AMF Life Systems. A temperatura de aquecimento foi controlada por sonda óptica inserida dentro das amostras durante o período de 900 s com posterior resfriamento de 360 s. A partir dos perfis de aquecimento das amostras controles, em 1,0 mL das amostras contendo curcumina foi aplicado campo com a frequência de 326 kHz com amplitude de CMA de 190 Oe durante o período de 180 a 900 s. Após cada intervalo de 180 s, as amostras foram decantadas magneticamente e o sobrenadante analisado em um fluorímetro Fluorolog-TSPC (Horiba-Jovine Ivone), conforme condições descritas no item 3.2.7.1. As medidas foram realizadas em triplicata e a quantidade de curcumina liberada foi determinada, utilizando a curva de calibração do corante, que relaciona a intensidade de fluorescência com a concentração conhecida de curcumina ($\mu\text{mol/L}$) na solução 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 a pH 7,4. Os resultados obtidos foram apresentados como

porcentagem de liberação de curcumina ao longo do tempo. O mecanismo de liberação foi analisado por meio do ajuste dos perfis da cinética de liberação, aplicando o modelo matemático de primeira ordem (Equação 1).

3.2.10. Teste biológico

3.2.10.1. Avaliação da atividade citotóxica

A linhagem celular de adenocarcinoma epitelial de mama humana (MCF-7) foi mantida rotineiramente em frascos de cultura celular (75 cm²) em uma incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 98% de umidade com 5,0 mL de meio de cultura de células DMEM contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) de antibiótico (10.000 UI/mL de penicilina – 10.000 µg/mL de estreptomicina, Life Technologies, EUA) e removido a cada três ou quatro dias. Após atingir o estágio de confluência, elevada densidade de células em uma determinada área, as células foram removidas do frasco de cultura, utilizando-se 500 µL de 0,25 % de Tripsina-EDTA (Life Technologies, EUA) e recultivadas em uma densidade menor.

A viabilidade celular foi então determinada pelo ensaio de brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-bifenil tetrazólio (MTT), em que as células MCF-7 foram transferidas para placas de cultivo de 96 poços com uma densidade de 5 x 10³ células/poço e incubadas com diferentes concentrações (40 a 100 µmol/L) de amostras brancas, amostras contendo curcumina e curcumina livre a 37°C e 5% de CO₂. O pH das amostras foi ajustado para 7,4 com solução 1,0 mol/L de NaOH antes de serem semeadas com as células. Após 72h de incubação, o tratamento foi removido e adicionou-se 150 µL de solução 0,5 mg/mL de MTT em DMEM a cada poço com posterior incubação a 37°C e 5% de CO₂ durante 3h. Para solubilizar os cristais de formazan o meio de cultura foi removido e adicionou-se 200 µL de sulfóxido de dimetil (DMSO). A absorbância de cada amostra foi monitorada, utilizando um espectrofotômetro com um leitor de microplacas com um comprimento de onda de 595 nm (SpectraMax[®], modelo M2, Molecular Devices, EUA). A viabilidade das células não tratadas (grupo controle) foi considerada como máxima (100 %) e a porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a Equação 11:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Abs. do grupo tratado}}{\text{Abs. do grupo controle}} \times 100 \quad \text{(Equação 11)}$$

Todos os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e expressos como média \pm Desvio Padrão (DP). A diferença entre o efeito das células tratadas em comparação com as células não tratadas (grupo controle) foi verificada por análise de variância (ANOVA) e *post test Tukey*, utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5.0. Os valores significativamente diferentes do grupo controle em $P < 0,05$ foram indicados por um asterisco.

3.2.10.2. Estudo de internalização das amostras nas células MCF-7

Para a análise da captação das amostras, 8×10^5 de células MCF-7 foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços e, após a adesão, as células foram expostas a 100 $\mu\text{mol/L}$ de amostras de MC@3Curc e de curcumina livre durante 6h. As células desaderidas em microtubos foram então lavadas com PBS e fixadas com solução de *Karnovsky* (2,5 % de glutaraldeído, 4,0 % de paraformaldeído, 5,0 mmol de CaCl_2 , 3,0 % de sacarose, tamponado em 0,1 mol/L de cacodilato de sódio a pH 7,2) durante a noite a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas durante 30 min em 1,0 % de tetróxido de ósmio, 0,8 % de ferricianeto de potássio e 5,0 mmol de CaCl_2 , em tampão de 0,1 mol/L de cacodilato de sódio. As células foram lavadas duas vezes com água tipo 1 e depois contrastadas com 0,5 % de acetato de uranila a 4°C. As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de acetona (30 a 100 %) durante 10 min cada e incluídas em resina *Spurr*. As seções ultrafinas foram obtidas com um ultra micrótomo (Leica, UCT, AG, Viena, Áustria) e analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEOL JEM-2100, equipado com EDS, *Thermo scientific*.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

Na obtenção da quitosana via *N*-desacetilação da quitina, os grupos acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) das unidades de *N*-acetilglicosamina (*GI-NAC*), provenientes da quitina, são convertidos em grupos $-\text{NH}_2$, em taxas variadas, originando o heteropolissacarídeo, com diferentes graus médios de desacetilação. No entanto, o produto *N*-desacetilado da quitina só passa a ser considerado quitosana quando o GD se torna maior ou igual a 50 %, percentagem a partir da qual o polímero se torna solúvel em soluções ácidas diluídas.¹²⁷

Há várias técnicas descritas na literatura para determinar o %GD da quitosana, tais como: espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (RNM ^1H), análise elementar (CHNOS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), termogravimetria (TG/DTG), dentre outras. No entanto, neste estudo foi utilizado o método de titulação condutimétrica, por ser uma técnica simples e bastante precisa. A curva dos valores de condutividade versus o volume de titulante estão apresentados na Figura 16.

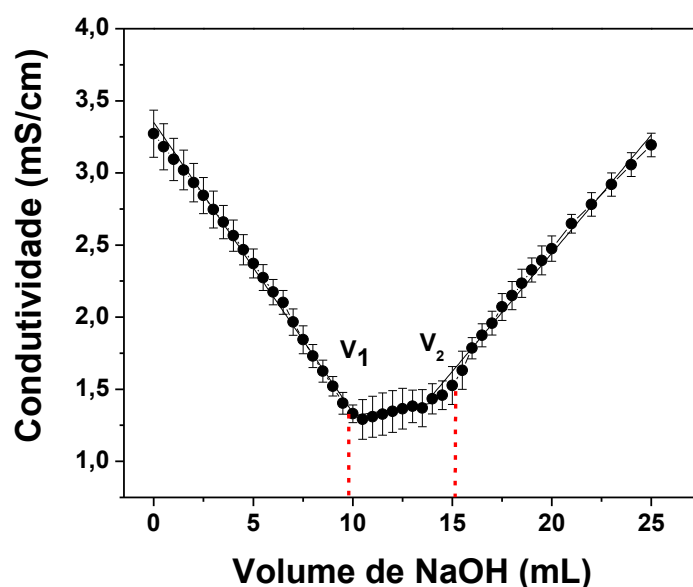


Figura 16 - Curva de titulação condutimétrica obtida para a quitosana.

Na curva de titulação da quitosana se observa dois pontos de inflexão. O primeiro correspondente à neutralização do HCl em excesso e o segundo ponto resulta da neutralização dos grupos amina provenientes da quitosana. A diferença entre os dois pontos de equivalência corresponde ao volume de titulante ($V_1 = 9,5$ mL e $V_2 = 15,3$ mL) necessários para neutralizar os grupos

amina. Desta forma, o %GD para a quitosana foi de 76,9 %, indicando que houve a conversão das unidades *N*-acetilglicosamina em grupos amina.

4.2. Caracterização das nanopartículas magnéticas

O sucesso da aplicação prática das NPMs depende da capacidade de controle do diâmetro, da forma e da aglomeração das partículas, o que é influenciado pelo método de síntese.¹²⁸ Assim, com o intuito de solucionar este problema, o método de decomposição térmica de precursores organometálicos em soluções orgânicas com alta temperatura tem sido bastante explorado na preparação de NPMs, já que é um método simples de ser executado, possui boa reprodutibilidade, baixo custo e permite a obtenção de NPMs estáveis e monodispersas.^{129,130}

Desta forma, neste estudo, utilizou-se a técnica de decomposição térmica para obtenção de nanopartículas de $MnFe_2O_4$. No entanto, após a decomposição térmica, devido à superfície destas terem sido revestidas com oleilamina, as NPMs são hidrofóbicas e, portanto, incompatíveis para a interação com os polímeros hidrofílicos (quitosana e alginato).³⁵ Assim, antes do revestimento de polímeros, a oleilamina foi substituída por moléculas de citrato, por meio de um processo de troca de ligante, que conferem hidrofiliabilidade às NPMs e, conseqüentemente a capacidade de serem recobertas por meio de interações eletrostáticas atrativas com polímeros.

Ao final, a amostra obtida (denominada MC0) apresentou distribuição estreita ($PDI = 0,268 \pm 0,01$), diâmetro hidrodinâmico na faixa de $97,1 \pm 4,4$ nm, indicando homogeneidade na dispersão, potencial zeta negativo com valor em módulo alto ($-35,1 \pm 0,8$ mV) e fração volumétrica (ϕ) igual a 1,5 %.

Na Figura 17, observa-se o difractograma de raios X das NPMs com citrato (amostra MC0) na faixa angular de 20° a 80° . Os picos de difracção observados foram indexados e comparados ao cartão JCPDS nº 74-2403, indicando a presença de uma fase espinélio em relação a $MnFe_2O_4$. Além do que, não foram determinadas outras fases cristalinas nos difractogramas.

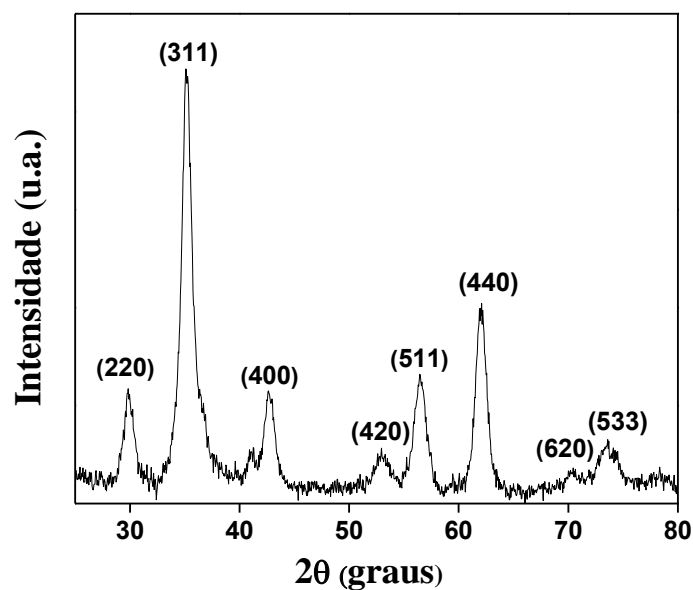


Figura 17 – Difratoograma de raios X obtido para a amostra MC0.

O diâmetro médio cristalino do núcleo magnético foi calculado a partir do alargamento do pico de reflexão de Bragg (311) de maior intensidade no DRX, utilizando o formalismo de *Scherrer* (Equação 12), que relaciona a dimensão dos nanocristais com a largura do pico de reflexão de Bragg.

$$D = \frac{k\lambda}{(FWHM)\cos\theta} \quad \text{(Equação 12)}$$

Na qual ***FWHM*** é a largura à meia altura do pico de difração e ***k*** é igual a 0,9 e ***λ*** é o comprimento de onda da radiação. Desta forma, o diâmetro médio cristalino obtido para a amostra MC0 foi de 12,0 nm.

A Figura 18 mostra a imagem de MET obtida para a amostra citratada (MC0), em que se observa a formação de nanopartículas quase esféricas e relativamente dispersas.

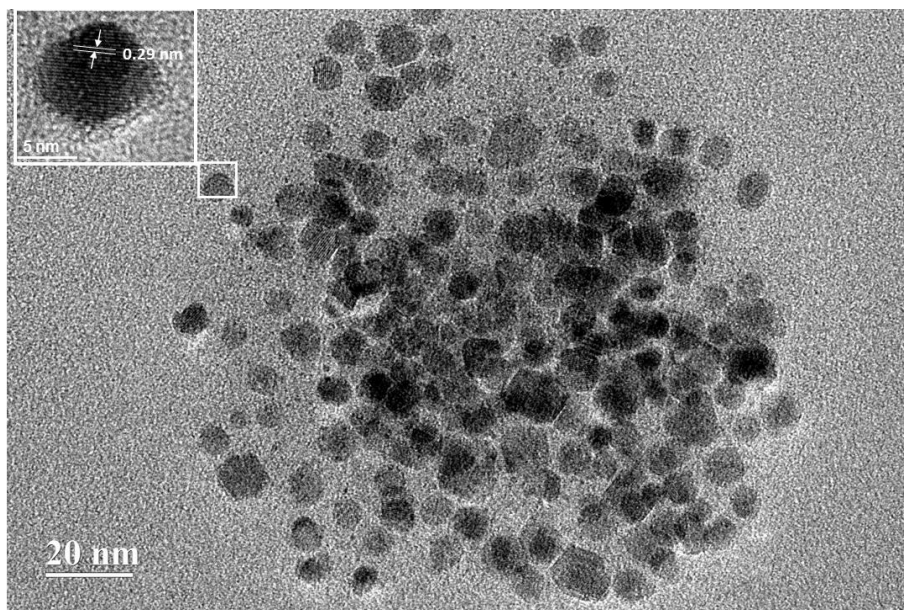


Figura 18 – Imagem de MET obtida para a amostra MC0 (escala = 20 nm).

A dedução da distribuição do diâmetro para a amostra MC0 foi realizada, calculando-se o perímetro de um grupamento de NPMs em diferentes micrografias, totalizando a contagem de ~300 partículas. Esse processamento foi realizado com o auxílio do programa ImageJ® e o histograma de diâmetro correspondente às partículas está apresentado na Figura 19.

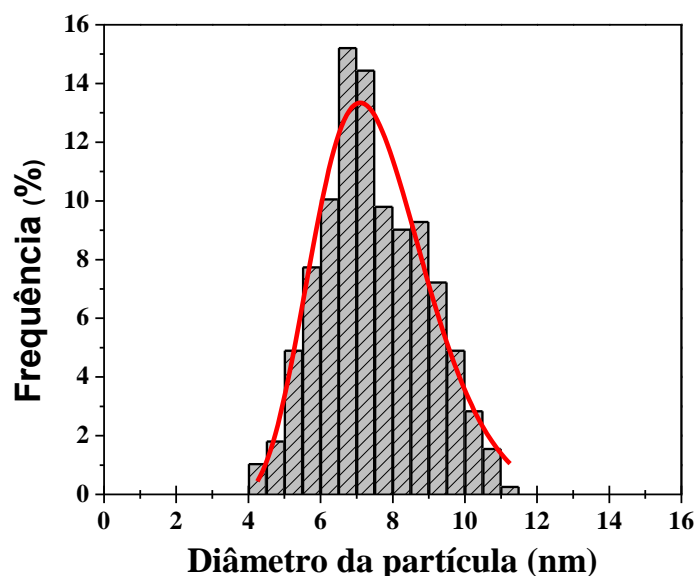


Figura 19 – Histograma de distribuição do diâmetro obtido para a amostra MC0.

A definição dos intervalos no histograma foi realizada por meio do método de *Sturges* e a função que melhor ajusta o histograma é do tipo *log-normal*, dada pela Equação 13:

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}sd} \exp\left[\frac{-1}{2s^2}\left(\ln \frac{d}{d_0}\right)^2\right] \quad \text{(Equação 13)}$$

Em que d_0 é o diâmetro característico ($\ln d_0 = \langle \ln d \rangle$) e s é a largura característica da dispersão relacionada à distribuição. O diâmetro mais provável para a distribuição é dado por $d_{mp} = d_0 \exp(-s^2)$ e o diâmetro médio $\langle d \rangle = d_0 \exp(-s^2/2)$. A partir do ajuste dos dados, o diâmetro médio para as nanopartículas foi de 8,93 nm e a polidispersão igual a 0,48.

Além disso, o espaçamento de rede (0,29 nm) na inserção superior esquerda obtido na imagem HRTEM concorda com a distância entre os planos de rede (220), corroborando os dados DRX. Este resultado está de acordo com os resultados relatados na literatura para a MnFe_2O_4 com estrutura de espinélio normal.¹³¹

A amostra MC0 ainda foi caracterizada por meio das técnicas de FTIR, XPS, TGA, ICP-OES, Magnetização de saturação e análise porosimétrica e da área superficial por BET. Os resultados obtidos estão descritos e discutidos juntamente com as características das NPMs funcionalizadas com polímeros (item 4.5), a fim de estabelecer uma comparação antes e após a funcionalização de sua superfície.

4.3. Determinação do pKa e da densidade de carga superficial

Durante o protocolo de troca de ligantes, o ácido cítrico (uma espécie triprótica) liga-se à superfície da MnFe_2O_4 por meio de grupos carboxilato. Alguns grupos, entretanto, permanecem orientados para a solução e podem ser ionizados, fornecendo uma carga de superfície para as NPMs. Assim, pode-se assumir que a superfície das nanopartículas funcionalizadas com citrato, aqui representada por $\blacktriangleright\text{-COOH}$ (protonado) ou $\blacktriangleright\text{-COO}^-$ (desprotonado), está se comportando como um sistema de ácido monoprótico e seguindo um modelo de 1-pKa.¹¹⁹ De maneira similar, a quitosana e o alginato polifuncionais (com grupos -NH_2 e -COOH , respectivamente) podem ser ionizados em meio aquoso, seguindo também o modelo 1-pKa, no qual a quitosana é representada por $\text{QTS-NH}_3^+/\text{QTS-NH}_2$ e o alginato como $\text{ALG-COOH}/\text{ALG-COO}^-$ em suas

formas protonadas/desprotonadas.

Assim, considerando que o revestimento no processo de deposição LbL é baseado primeiramente na interação eletrostática entre as NPMs citratadas com o polímero QTS e, posteriormente, nas interações com ALG/QTS, esta será governada pelo número de sítios superficiais ionizáveis (tanto dos polímeros quanto da amostra MC0), que depende diretamente do pH das dispersões.⁹

Desta forma, antes da deposição de polímeros foram construídos os perfis de especiação, a fim de determinar o pH ideal para otimizar a interação atrativa entre a superfície das NPMs de MC0 e dos polímeros, por meio de titulações conductimétricas e potenciométricas simultâneas (Figuras 20).

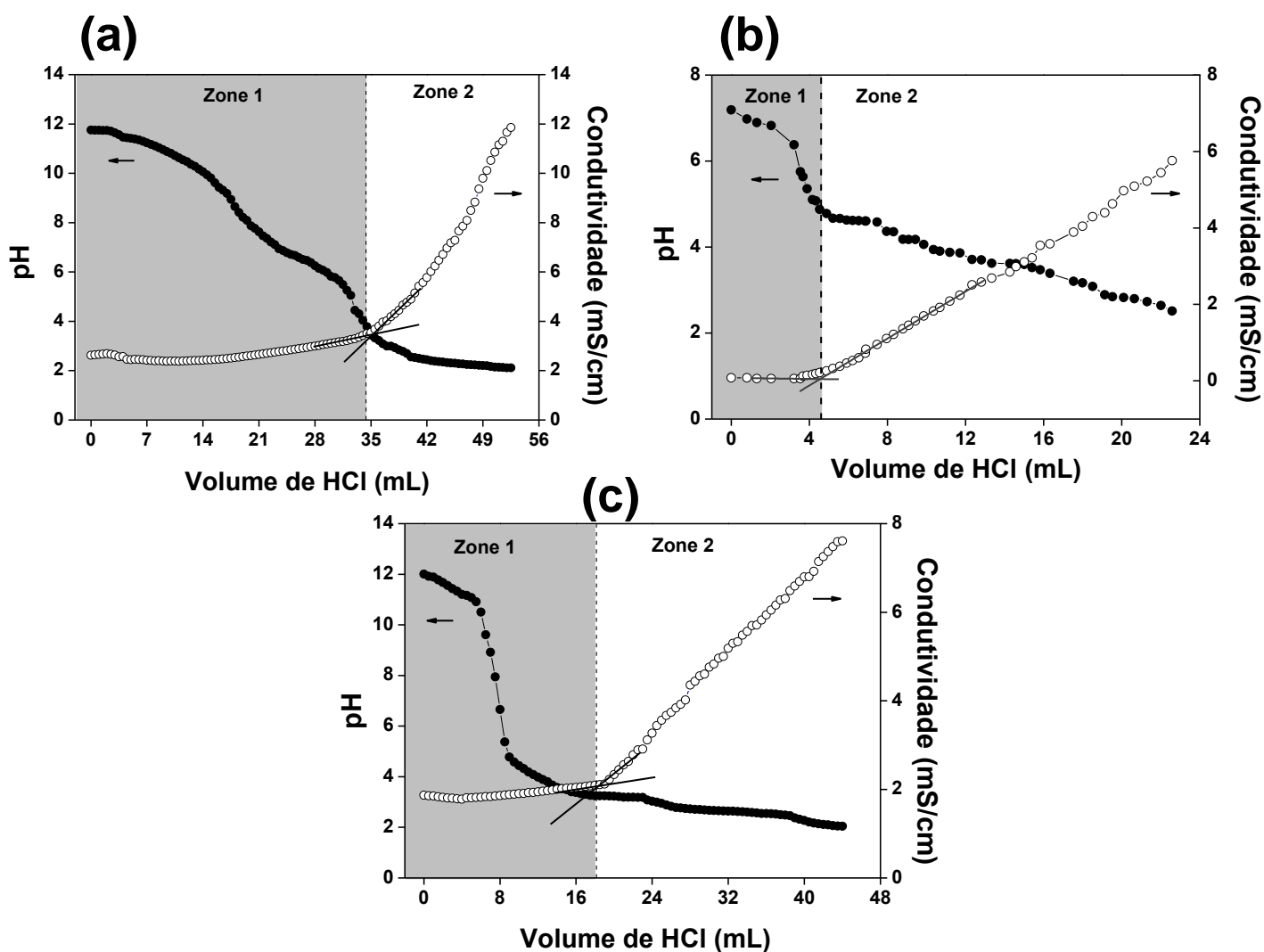
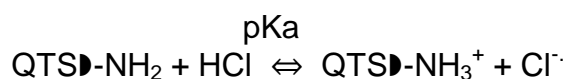


Figura 20 – Curvas de titulação potenciométrica (●) e condutimétrica (○) obtidas para as amostras: (a) MC0, (b) QTS e (c) ALG.

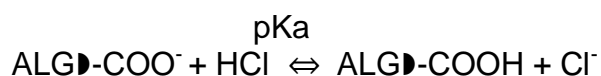
Nas curvas de titulação observam-se duas zonas distintas para a amostra MC0 (Figura 20a), onde inicialmente ocorre uma redução na condutividade decorrente da titulação dos grupos carboxílicos ligados à superfície das NPMs. Após a completa protonação dos grupos carboxílicos, marcando o fim da primeira zona observa-se um aumento acentuado na condutividade resultante do excesso de ácido forte (titulante).

A Figura 20b mostra as curvas de titulação da QTS, em que se observa também duas zonas distintas. Na primeira zona o pH da dispersão de QTS está acima do seu pKa (~6,30), fazendo com que os grupos -NH₂ fiquem desprotonados. À medida que o titulante (HCl) é adicionado, aumenta-se a solubilidade da QTS, tornando a dispersão transparente. Isto ocorre devido à protonação dos grupos -NH₂ livres na superfície da QTS, conforme a reação de dissociação:



Com a redução do pH e a protonação dos grupos -NH₂ até o ponto de equivalência observa-se um aumento nos valores de condutividade devido à ao excesso de titulante (zona 2), o que condiz com os valores de inclinação dos dois segmentos lineares da curva de condutividade.

Nas curvas de titulação do ALG (Figure 20c) observam-se duas zonas correspondentes a dois fenômenos físico-químicos distintos. Na primeira zona observa-se a protonação do grupo carboxílico, conforme descrito na reação de dissociação:



O fim da primeira zona é marcado pelo ponto de equivalência após a completa protonação dos grupos carboxílicos. Na segunda zona observa-se que a redução moderada do pH da dispersão de ALG conduz a um aumento na condutividade, devido da adição de H₃O⁺ a dispersão.

Nas curvas de titulação de todas as amostras foi possível observar apenas um ponto de equivalência, localizado na intersecção dos dois segmentos lineares das zonas 1 e 2, que pode ser visualizado na curva de

condutividade, a partir do qual os valores de pKa e de densidade de carga superficial (σ_0) foram estimados, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de pKa e de densidade de carga superficial.

Amostra	Valores de pKa	Densidade de carga (σ_0)
MCO	4,0	- 0,31 C/m ²
Quitosana	6,3	+ 3,60 ± 0,04 mmol/g
Alginato	3,3	- 3,34 ± 0,05 mmol/g

Assim, levando em consideração o modelo de 1-pKa e os valores de pKa obtidos foi traçado um diagrama de especiação da superfície da amostra MCO e dos polímeros em função do pH, conforme visualizado na Figura 21.

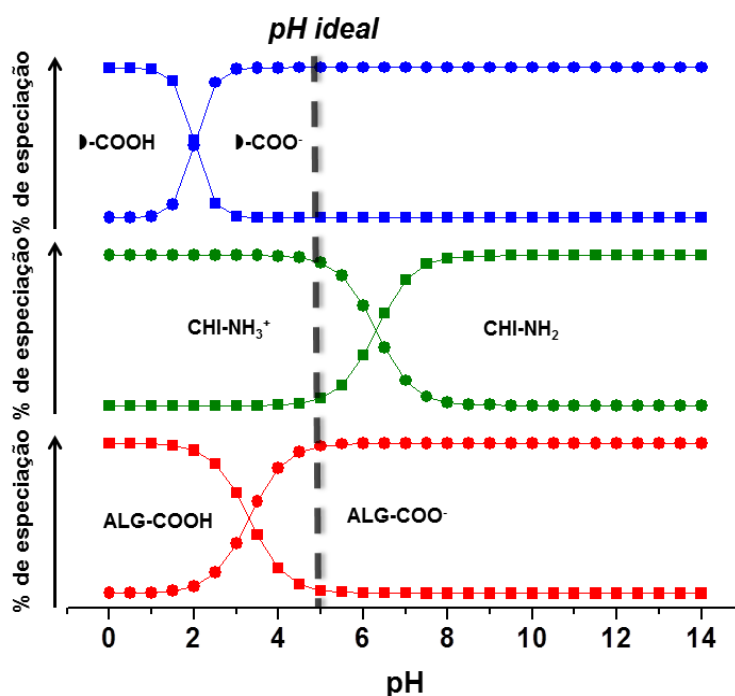


Figura 21 – Diagrama de especiação dos sítios superficiais de MCO (azul), QTS (verde) e ALG (vermelho) em função do pH.

A partir do diagrama de especiação, observou-se que a fração molar dos sítios protonados é dada por $\alpha_0 = [H_3O^+]/([H_3O^+] + K_a)$ e a dos sítios desprotonados por $1 - \alpha_0$ ¹⁹, sendo que a protonação superficial de NPMs com citrato ($\blacktriangleright-COO^-$) aumenta com o pH > pKa. Para o alginato, observou-se um comportamento semelhante, isto é, os sítios ionizados ($ALG-COO^-$) também aumentam de acordo com o pH > pKa. Por outro lado, para a quitosana em pHs inferiores ao valor do seu pKa ocorre a ionização efetiva de grupos amina

(QTS-NH₃⁺).

Assim, para o revestimento de polímeros, considerando a deposição eletrostática, a melhor interação entre a amostra MC0 e a quitosana (durante a formação da primeira camada) ocorrerá a um pH localizado entre o pKa destas duas espécies (pH ~ 5,2). Entretanto, na deposição das camadas subsequentes, também se espera que a melhor interação entre a quitosana e o alginato ocorra em pH localizado entre os pKas de suas espécies químicas (pH ~ 4,8). Desta forma, o pH de todas as soluções utilizadas no revestimento por polímero durante o processo de deposição LbL foi ajustado para ~ 5,0, em que a diferença na magnitude da carga oposta é maior antes das interações. Além disso, a curcumina, que apresenta grupos ionizáveis (fenólicos e cetoenólicos), pode interagir eletrostaticamente melhor com o polícatión de quitosana do que com o poliânion de alginato.

4.4. Avaliação da interação entre os polímeros

A interação eletrostática entre os polímeros (quitosana e alginato) também foi monitorada por meio de medidas em microbalança de cristal de quartzo (QCM-D). Para isto, preparou-se soluções dos polímeros e da quitosana contendo curcumina em pH 5,0, conforme descrito nos itens 3.2.2. As soluções foram previamente filtradas, utilizando-se microfiltros de membrana com diâmetro de 22 nm e, posteriormente, depositadas no cristal de QCM-D (Figura 22) por meio da injeção nas células de reação.

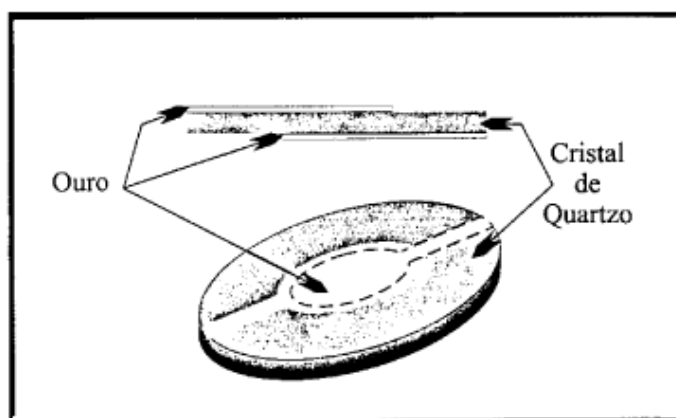


Figura 22 – Desenho esquemático de um cristal de QCM-D. (Varela et al.¹³²).

O aumento de massa depositada foi calculado com base na alteração na frequência de ressonância do cristal de quartzo e os resultados estão apresentados na Figura 23.

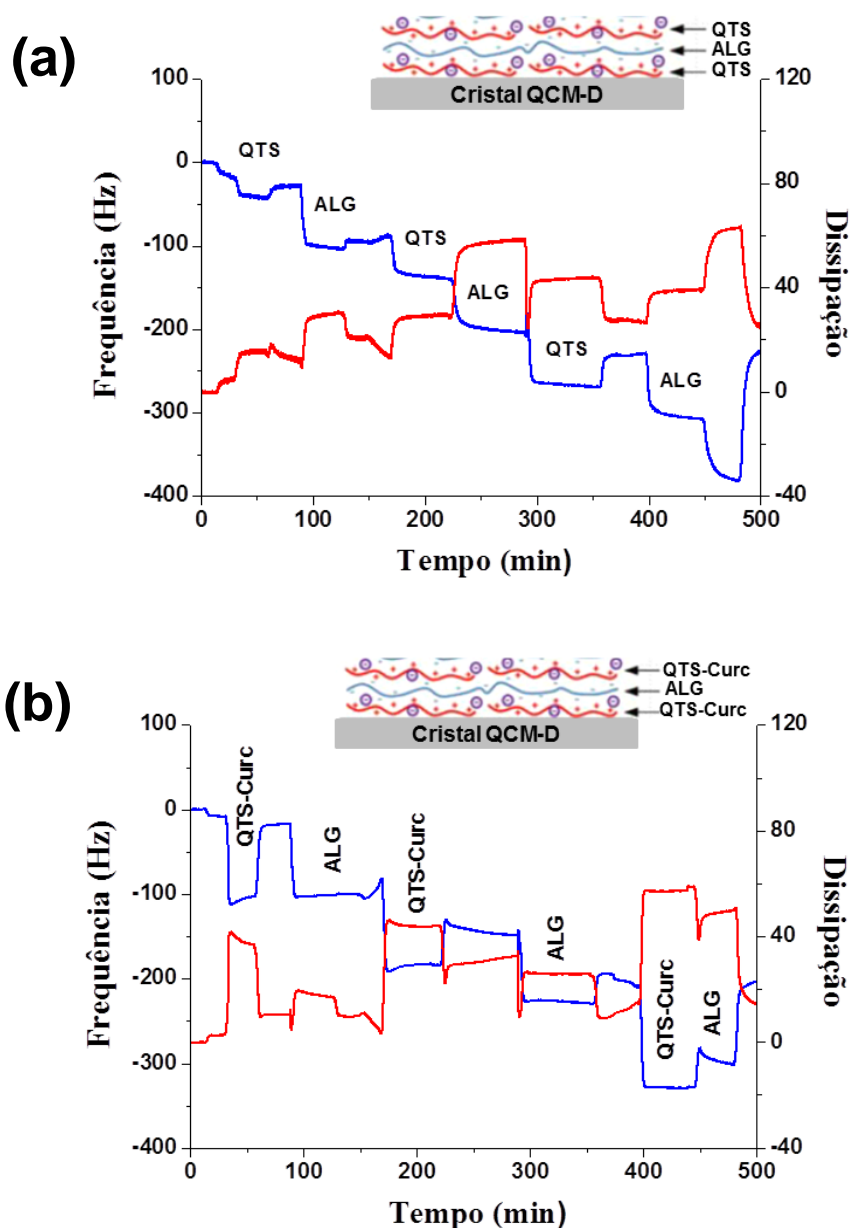


Figura 23 – Massa depositada no cristal de QCM-D em função da variação da frequência de ressonância para: (a) QTS/ALG e (b) QTS-Curc/ALG.

Na Figura 23a, observa-se que a massa total de QTS/ALG depositada foi de 135,8 ng, sendo que para a QTS foi obtido uma massa de 67 ng e para o ALG 68,8 ng. Já a massa total de QTS-Curc/ALG depositada (Figura 23b) foi de 106,9 ng, sendo a massa de QTS-Curc igual a 35,1 ng e a massa ALG foi de 71,8 ng. Considerando, que a interação eletrostática ocorrida é controlada pela concentração molar dos sítios superficiais envolvidos, observa-se que

houve maior interação entre a QTS e o ALG do que entre a QTS-Curc e o ALG. Isto ocorre porque ao interagir com a curcumina, a densidade de cargas positivas provenientes dos grupos amina protonados da quitosana diminui, dificultando a interação da QTS com o ALG.²⁸

*Kaspar et al.*¹³³ e *Gregurec et al.*¹³⁴, demonstraram a eficiência da microbalança de quartzo ao avaliar a interação de multicamadas de hidrocloreto de poli-alilamina (PAH) e Poli(estireno sulfonato de sódio) (PSS) por meio do aumento de massa depositada no cristal de QCM-D, obtendo resultados semelhantes aos encontrados para o sistema QTS e ALG.

4.5. Caracterização das NPMs funcionalizadas com polímeros

4.5.1. Diâmetro, PDI e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico, o PDI e o potencial zeta são características muito importantes da NPMs, pois determinam a distribuição *in vivo*, destino biológico, a toxicidade e a capacidade de direcionamento. Além disso, estas características também podem influenciar na encapsulação e liberação do fármaco e, na estabilidade do sistema.¹³⁵ Assim, nesse sentido, estas características das amostras brancas e contendo curcumina foram determinadas a pH fixo = 5,0 e estão apresentadas na Figura 24 e Tabela 4.

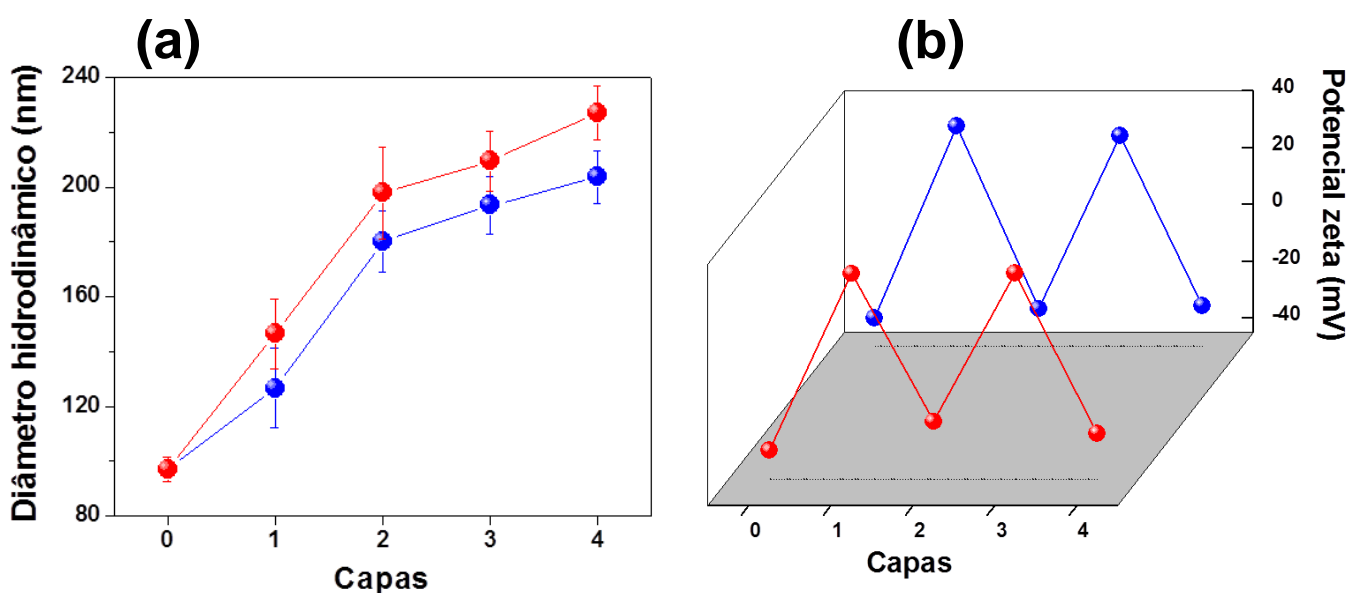


Figura 24 - Diâmetro hidrodinâmico (a) e potencial zeta (b) em função do número de camadas de polímeros. Amostras brancas (esferas azuis) e amostras contendo curcumina (esferas vermelhas).

Tabela 4 – Características das amostras funcionalizadas.

Amostras	Diâmetro (nm) ^a	PDI ^a	Potencial zeta (mV) ^a
MC0	97,1 ± 4,4	0,268 ± 0,01	-35,1 ± 0,9
MC@1	126,7 ± 14,4	0,149 ± 0,02	+32,2 ± 0,7
MC@2	180,2 ± 11,3	0,167 ± 0,02	-31,9 ± 2,2
MC@3	193,3 ± 9,5	0,128 ± 0,01	+28,8 ± 1,3
MC@4	206,6 ± 10,5	0,221 ± 0,02	-30,9 ± 1,8
MC@1Curc	146,6 ± 12,7	0,303 ± 0,03	+27,3 ± 0,6
MC@2Curc	197,9 ± 16,7	0,309 ± 0,02	-24,8 ± 1,2
MC@3Curc	209,5 ± 9,9	0,204 ± 0,04	+27,5 ± 1,3
MC@4Curc	227,1 ± 10,9	0,339 ± 0,02	-28,9 ± 0,7

^a análise realizada em triplicata, n = 3.

Por meio das medidas de DLS foi possível verificar que o diâmetro hidrodinâmico (Figura 24a) aumenta à medida que aumenta as camadas de polímeros depositadas na superfície da amostra MC0. Nas amostras contendo curcumina, observa-se que os diâmetros hidrodinâmicos são sistematicamente maiores que as amostras brancas, variando de 97,1 nm (MC0) a 227,1 nm após duas bicamadas (amostra MC@4Curc). Isso indica o sucesso da deposição de polímeros e que as nanoestruturas formadas existem como soluções coloidais estáveis.

Na Figura 24b, pode-se observar que há uma inversão no potencial zeta entre positivo e negativo ($\sim \pm 30$ mV), devido às propriedades catiônicas e aniônicas dos polímeros. O potencial zeta inicialmente negativo para a amostra MC0 varia para positivo/negativo, alternadamente, à medida que a quitosana ou o alginato são depositados na superfície das NPMs, respectivamente.

As amostras contendo curcumina apresentaram comportamento semelhante, porém com uma redução no valor em módulo do potencial zeta. Isto corre porque em pH 5,0 todos os grupos NH_2 da quitosana estão protonados e livres, porém, ao interagir com os grupos fenólico ou ceto-enólicos da curcumina, via ligação de hidrogênio, a densidade dos grupos NH_3^+ livres em solução diminui, resultando em uma redução no valor em módulo do potencial zeta das nanopartículas.^{28,136}

De acordo com *Silva et al.*¹³⁷, a incorporação de substâncias ativas pode influenciar na estrutura superficial e interna dos materiais devido a diversos fatores como, diâmetro, peso molecular, as interações com a matriz polimérica, dentre outros.

4.5.2. Potencial zeta em função do pH

A eficiência na funcionalização da amostra MC0 também foi avaliada utilizando medidas de potencial zeta em função do pH. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25.

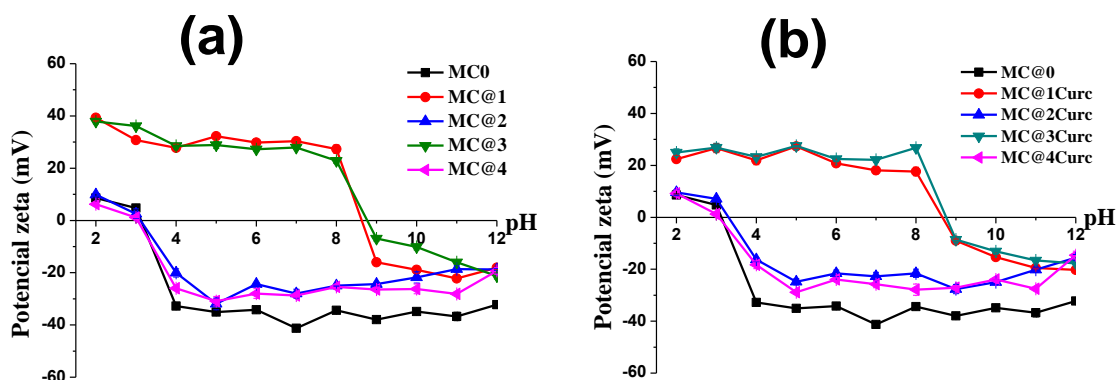


Figura 25 – Potencial zeta em função do pH obtido para as amostras brancas (a) e para as amostras contendo curcumina (b).

A partir da curva de potencial zeta obtida na Figura 25, verifica-se que a amostra MC0 apresenta ponto isoelétrico em pH ~ 3,0. Em valores de pH inferiores ao pKa estimado para a amostra MC0, observa-se um potencial zeta positivo, já que os grupos $-\text{COOH}$ provenientes do citrato estão protonados. Em contrapartida em valores de pH acima do seu pKa, os grupos carboxílicos estão desprotonados, gerando um potencial zeta negativo com valor em módulo relativamente alto.

À medida que as capas de polímero são depositas ocorre uma mudança no potencial zeta. Ao analisar as amostras MC@1 e MC@3 (Figura 25a) e MC@1Curc e MC@3Curc (Figura 25b), em que foi depositado QTS e QTS-Curc, respectivamente, observa-se que o ponto isoelétrico muda drasticamente para pH ~ 9,0, observando um potencial zeta positivo quando o pH é inferior ao pKa da quitosana, devido à presença de grupos $-\text{NH}_2$ protonados.

Em contrapartida, as amostras revestidas com alginato MC@2 e MC@4 (Figura 25a) e MC@2Curc e MC@4Curc (Figura 25b) apresentam potencial zeta cada vez mais negativo em pHs acima do pKa do alginato. Nessas amostras o ponto isoelétrico está localizado em pH ~ 3,0, semelhante ao ponto

isoeletrico estimado para a superfície das NPMs revestida com citrato, já que o citrato e o alginato possuem grupos semelhantes (-COOH/-COO⁻).

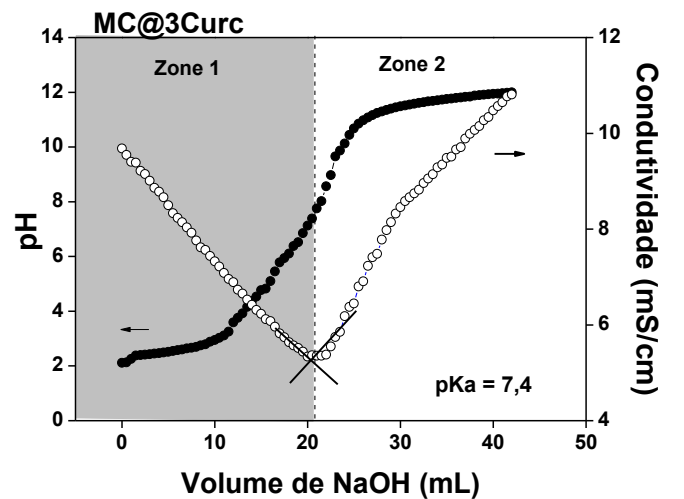
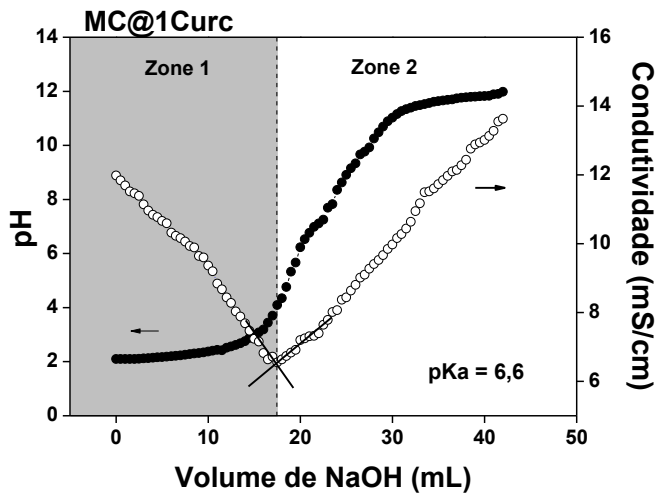
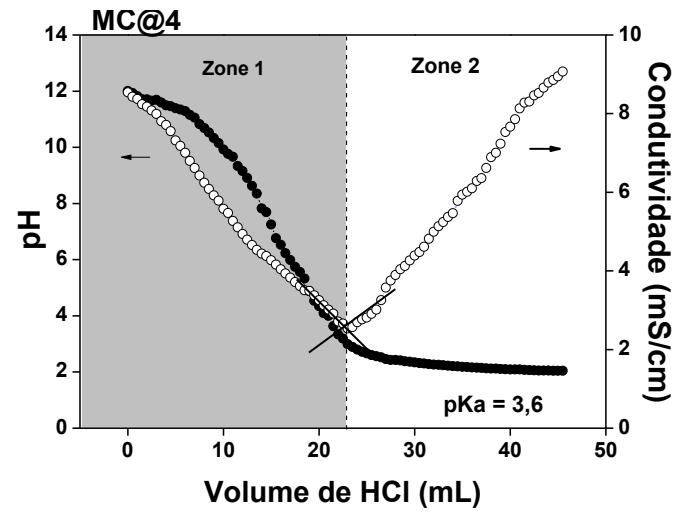
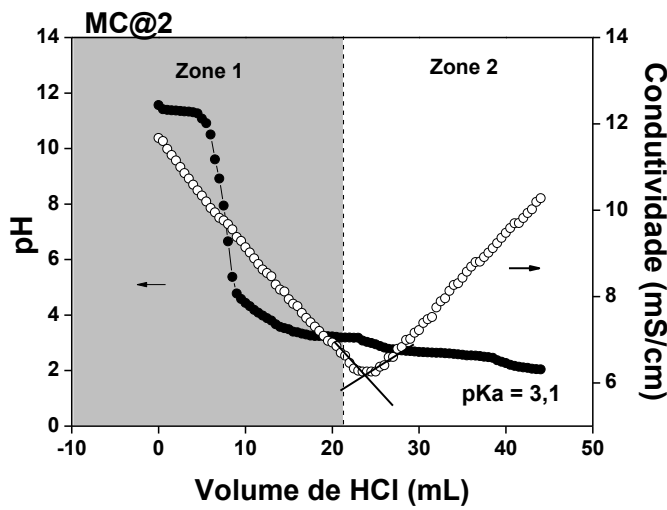
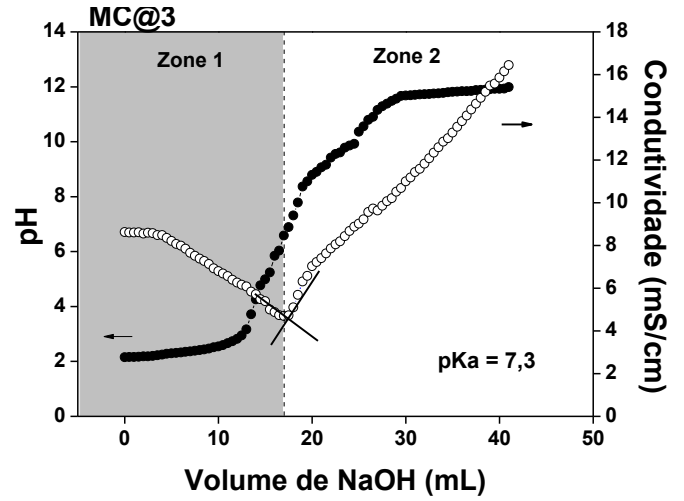
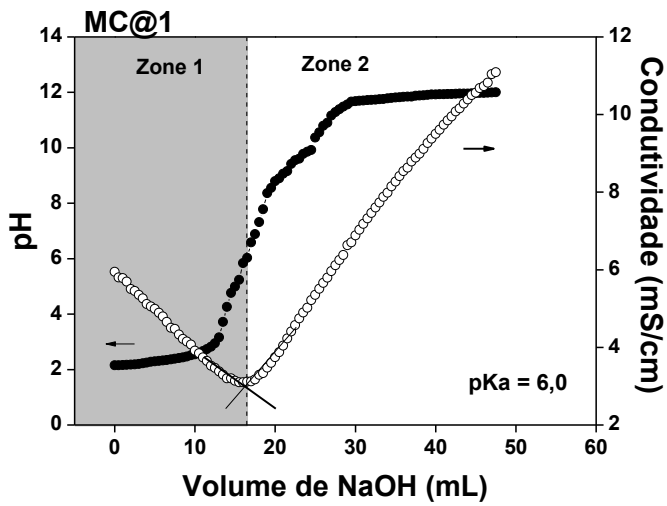
As alterações observadas no potencial zeta das capas quando comparado ao potencial zeta da amostra MC0 mostram a eficiência na funcionalização da amostra e que os polímeros são sensíveis ao pH, uma vez que, o grau de ionização é significativamente alterado em virtude de uma variação no pH próximo ao valor de pKa de seus grupos superficiais.¹²²

Não obstante, a similaridade entre as magnitudes de potencial zeta da primeira e segunda bicamada (Figura 25) é um indicativo da formação de multicamadas uniformes na superfície de NPMs, como relatado por *Mendoza-Dorantes et al.*¹³⁸. Os autores também relataram que o diâmetro pequeno e o alto valor em módulo do potencial zeta de substratos são fatores que induzem a adsorção de camadas homogêneas de polímeros. No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor a homogeneidade do nanossistema obtido neste estudo.

4.5.3. Determinação do pKa

O pKa das amostras brancas e contendo curcumina foi determinado por meio de titulação potenciométrica e condutimétrica simultâneas e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 26. As curvas de titulação para todas as capas mostram claramente que o sistema mantém o comportamento de ácido-base monoprótico, resultando em apenas dois sítios superficiais distintos pH-dependente.

Para as amostras MC@1 e MC@3 e MC@1Curc e MC@3Curc, onde foram depositadas QTS e QTS-Curc, respectivamente, observa-se duas zonas distintas, porém inversa ao observado nas titulações da quitosana. Nessas amostras, na primeira zona, os grupos -NH₂ encontra-se protonados. À medida que o titulante (NaOH) é adicionado verifica-se uma redução nos valores de condutividade, sendo o fim da primeira zona correspondente ao total de grupos -NH₃⁺ titulados. Na segunda zona, observa-se um aumento acentuado na condutividade devido ao excesso de titulante.



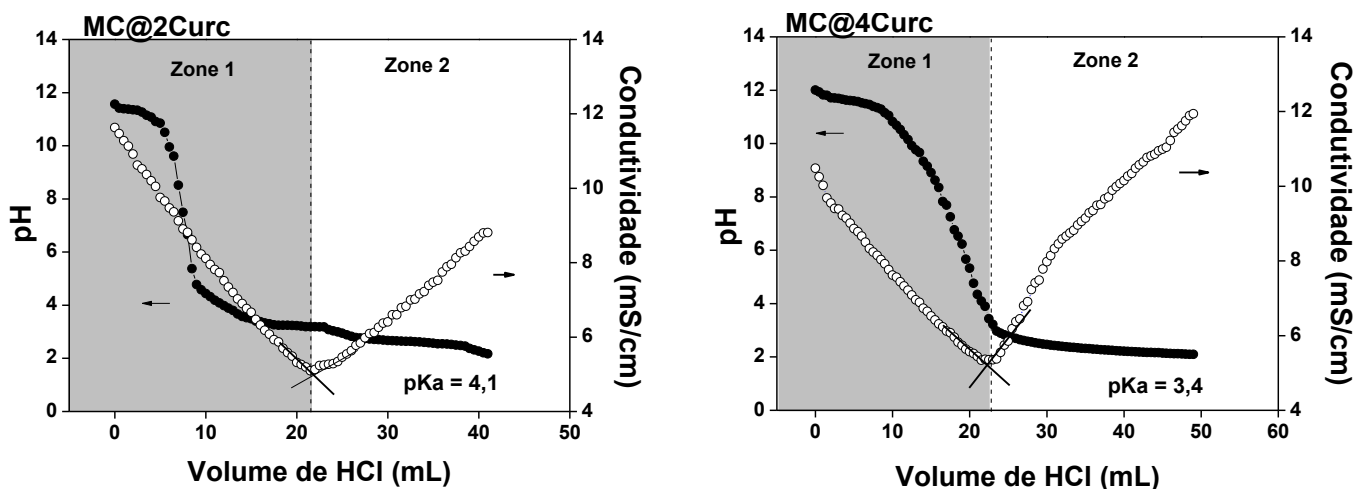


Figura 26 – Curvas de titulação potenciométrica (●) e condutimétrica (○) obtidas para as amostras funcionalizadas.

Já nas curvas de titulação das amostras MC@2 e MC@4 e MC@2Curc e MC@4Curc, onde foi depositado alginato, observa-se também dois fenômenos físico-químicos distintos, similares ao obtido nas titulações do alginato. Isto é, a zona 1 é marcada pela redução nos valores de condutividade devido à protonação do grupo carboxílico seguido de um aumento na condutividade (zona 2) devido do excesso de H_3O^+ na dispersão.

Verifica-se ainda que em todas as curvas o ponto de equivalência está localizado na intersecção dos dois segmentos lineares da curva de condutividade, por meio do qual se determinou os valores de pKa (indicados nas Figura 26) das amostras funcionalizadas.

Os valores de pKa obtidos para cada amostra indicam que houve um revestimento satisfatório da superfície da amostra MC0, já que concordam com o valor de pKa teórico e obtido experimentalmente para os biopolímeros.

4.5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A imagem típica de MET obtida para a amostra MC@4, em que NPMs foram revestidas com duas bicamadas de QTS/ALG está representada na Figura 27.

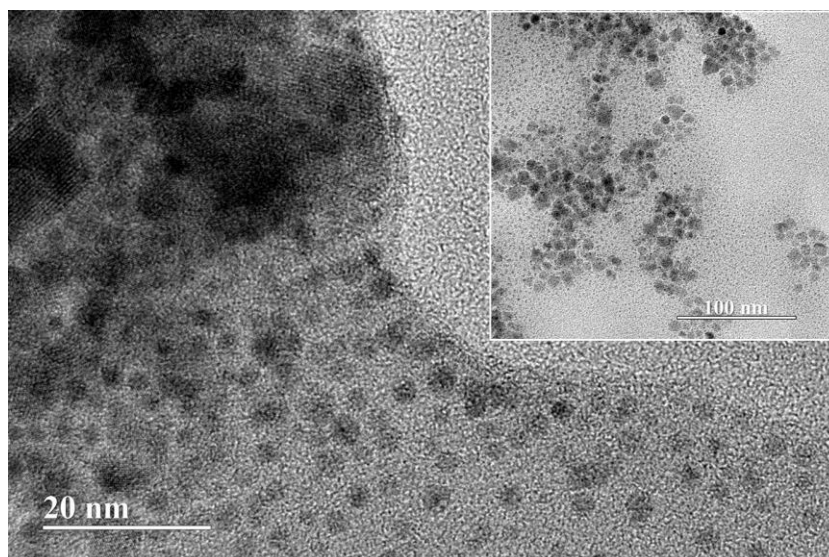


Figura 27 – Microscopia eletrônica de transmissão obtida para a amostra MC@4 com diferentes ampliações.

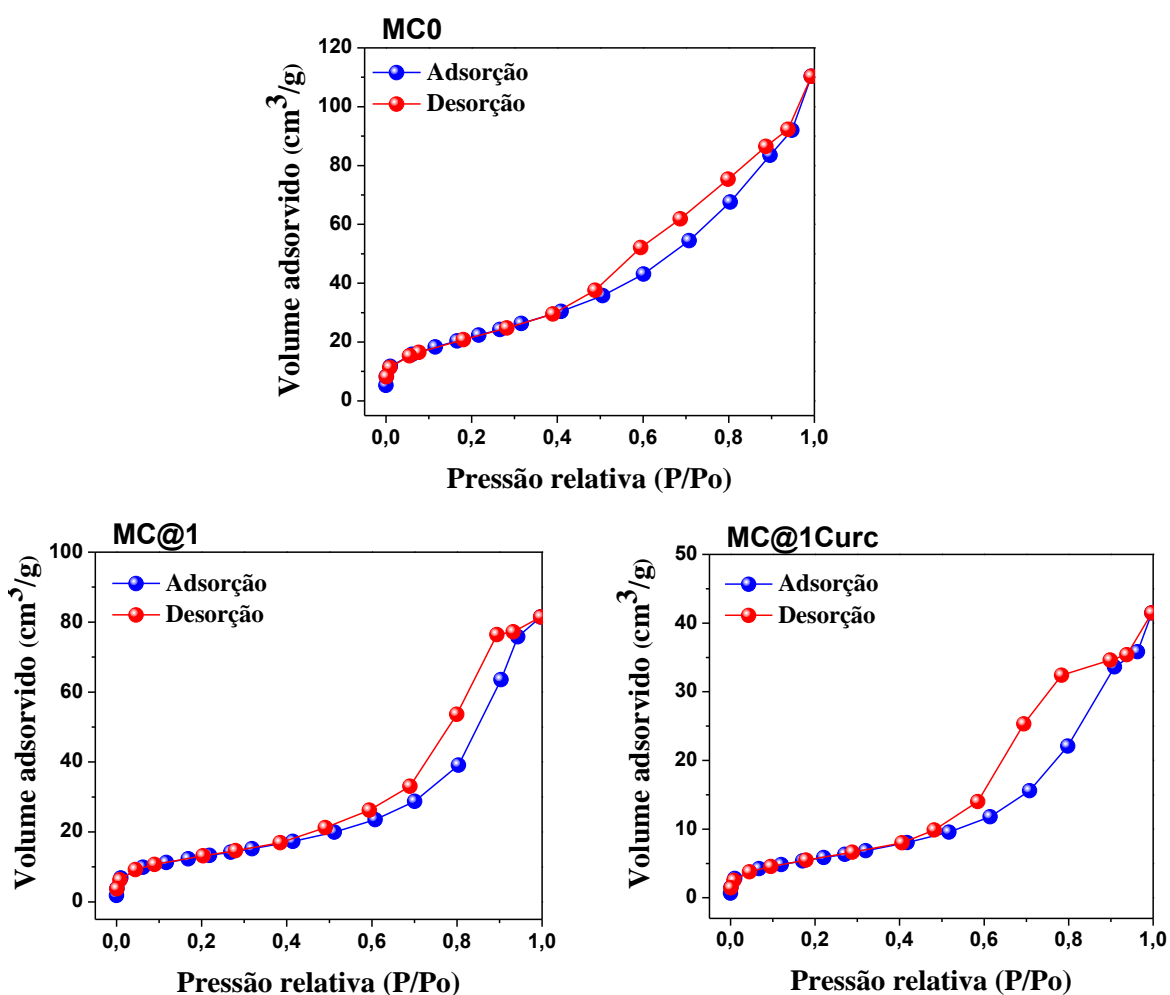
Conforme observado, as NPNs estão dispersas homogeneamente em uma fase polimérica com distâncias interpartículas de ~ 3-5 nm. Na Figura 27 foi possível observar que os agrupamentos de NPMs/polímeros não são homogêneos tanto em relação à morfologia quanto ao diâmetro. Resultados semelhantes foram obtidos por *Zhang et al.*¹³⁹ ao recobrir NPMs de Fe_3O_4 com quitosana para encapsulação da celulose e por *Lião et al.*¹⁴⁰ ao recobrir nanopartículas de magnetita com alginato.

Devido à formação de grandes aglomerados não foi possível realizar a contagem das nanopartículas e, conseqüentemente, a medida do diâmetro e da espessura da camada de polímeros nas amostras funcionalizadas. A formação dos aglomerados pode estar relacionada com a forte tendência à aglomeração polimérica¹⁴¹ e as interações magnéticas interpartículas¹⁴², principalmente durante a preparação da amostra para a análise de MET. No entanto, os diâmetros hidrodinâmicos moderados, os pequenos valores de PDI e os altos valores em módulo do potencial zeta, determinados por DLS associados à alta estabilidade coloidal observada indicam que, na solução, são encontradas nanoestruturas mais discretas.¹⁴³

As imagens de MET obtidas para as demais amostras com diferentes composições de camada de polímeros e/ou com curcumina apresentam perfis morfológicos e dimensionais semelhantes ao obtido para a amostra MC@4.

4.5.5. Análise porosimétrica e da área superficial por Brunauer–Emmett–Teller (BET)

Na Figura 28, encontra-se o perfil das isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas por BET para a amostra MC0 antes e após a funcionalização com polímeros. De acordo com a classificação da *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*¹⁴⁴ as isotermas obtidas para todas as amostras são do tipo IV, já que apresentam um laço de histerese que aparecem quando as curvas de adsorção e dessorção não coincidem.¹⁴⁴ A histerese ocorre em diferentes valores de pressão relativa e sua forma é determinada principalmente pela geometria dos poros. Assim, as isotermas das amostras analisadas possuem uma histerese do tipo H2, comum em materiais mesoporosos, que apresentam distribuição de tamanhos de poros e forma não muito bem definida.



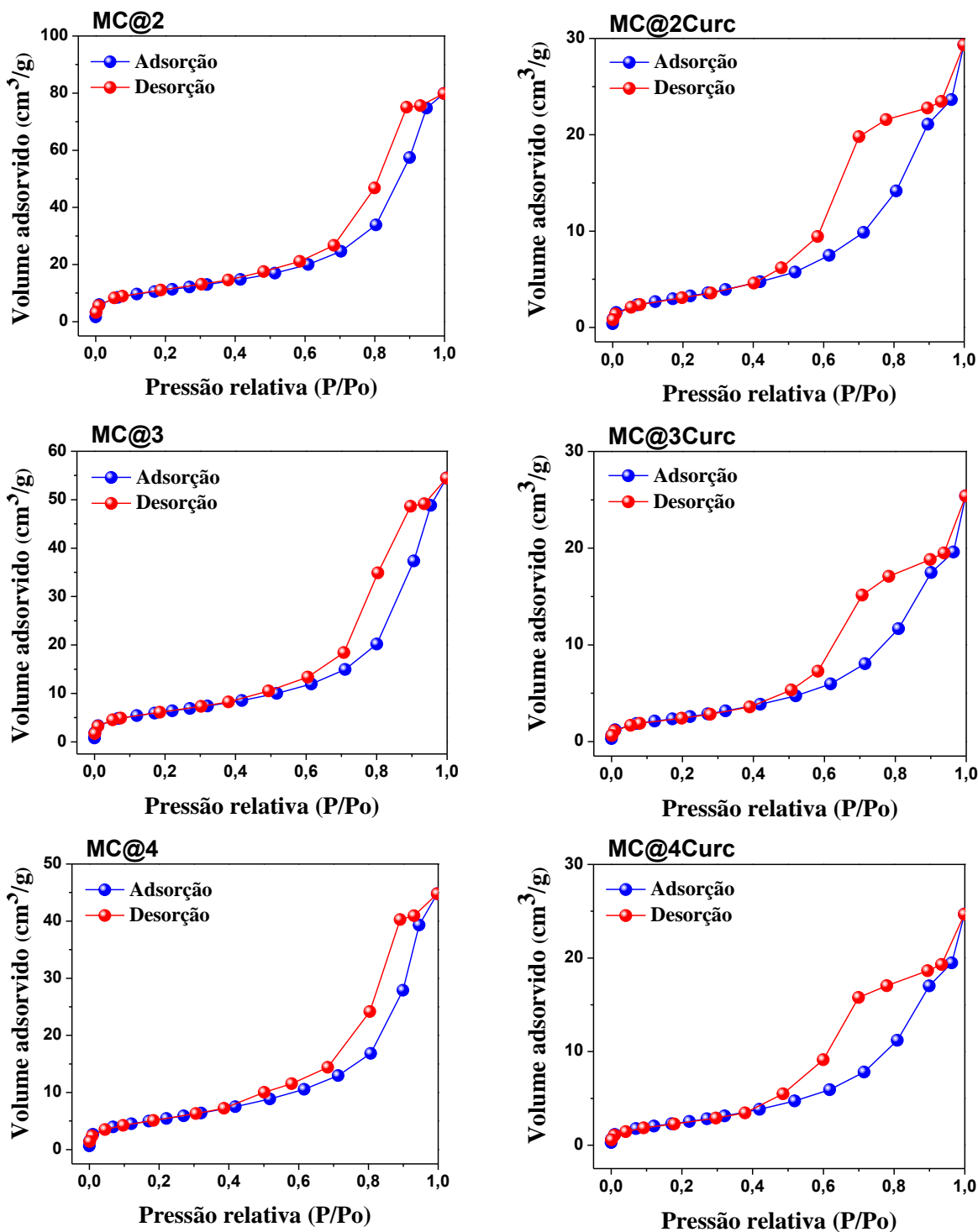


Figura 28 – Isothermas de adsorção/dessorção obtidas por BET para a amostra MC0 antes e após a funcionalização.

Com base nas isothermas de adsorção/dessorção, método BET, foi possível obter a área superficial, o volume médio dos poros e o diâmetro médio dos poros para a amostra MC0 antes e após a funcionalização com polímeros, cujos resultados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da porosidade obtidos por BET para a amostra MC0 antes e após a funcionalização com biopolímeros.

Amostras	Área superficial (m ² /g)	Volume médio dos poros (cm ³ /g)	Diâmetro médio dos poros (Å)
MC0	81,28	0,171	84,2
MC@1	43,18	0,126	109,4
MC@2	39,33	0,124	125,9
MC@3	22,45	0,084	150,4
MC@4	19,57	0,069	142,0
MC@1Curc	21,02	0,064	122,4
MC@2Curc	12,11	0,045	150,3
MC@3Curc	9,76	0,039	161,4
MC@4Curc	9,74	0,038	157,0

Os resultados de BET se apresentaram altamente satisfatórios, já que ocorreu uma redução na área superficial da amostra MC0 devido ao aumento da camada polimérica depositada em sua superfície. A redução na área superficial indica que as cavidades seletivas das NPMs ficam menos expostas após o recobrimento, isto é, a área superficial mantém uma relação direta com volume médio dos poros. Em contrapartida, se verifica que não houve uma correlação entre a área superficial e o diâmetro médio dos poros, não estando de acordo, com *Lowell e Shields*¹⁴⁵, que diz que a área superficial é inversamente proporcional ao diâmetro de poros.

Vale ressaltar que a falta de correlação entre o diâmetro médio de poros e a área superficial observada nas amostras funcionalizadas com polímeros pode estar relacionada às ligações entrecruzadas estabelecidas entre os polímeros durante o processo de deposição por LbL, que levaram a formação de poros com distribuição de tamanhos irregular.¹⁴⁶

Segundo a *IUPAC*¹⁴⁴ os poros podem ser classificados de acordo com seus diâmetros médios, isto é, microporos (diâmetro < 20 Å), mesoporos (diâmetro na faixa de 20 a 500 Å) e macroporos (diâmetro > 500 Å). Desta forma, as amostras analisadas são mesoporosas, já que os valores de diâmetro médio de poros obtidos estão na faixa de 20 a 500 Å. Este dado corrobora com o tipo de isoterma obtida para as amostras.

Nas amostras contendo curcumina observou-se que os valores de área superficial e volume médio de poros foram relativamente mais baixos, quando comparados aos valores obtidos para as amostras brancas. Isto indica a encapsulação do fármaco, que provoca alterações nas características das amostras.¹³⁷

Resultados semelhantes foram obtidos por *Yang et al.*¹⁴⁷, ao avaliar a porosidade e a área superficial de dois tipos de compostos híbridos inorgânicos/orgânicos baseados em nanotubos de sílica revestidos com polímeros sensíveis ao pH pelo método de deposição LbL para encapsulação e liberação da doxorrubicina. O primeiro composto híbrido consistiu em nanotubos de sílica revestidos com policloridrato de alilamina (PAH) e poliestireno sulfonato de sódio (PSS) e o segundo em nanotubos de sílica revestidos com quitosana e alginato de sódio. Os resultados mostraram que as isotermas obtidas para os dois compostos híbridos também foram do tipo IV e que ocorreu uma redução na área superficial e no volume médio de poros dos nanotubos à medida que os polímeros foram depositados, indicando a eficiência no revestimento.

4.5.6. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

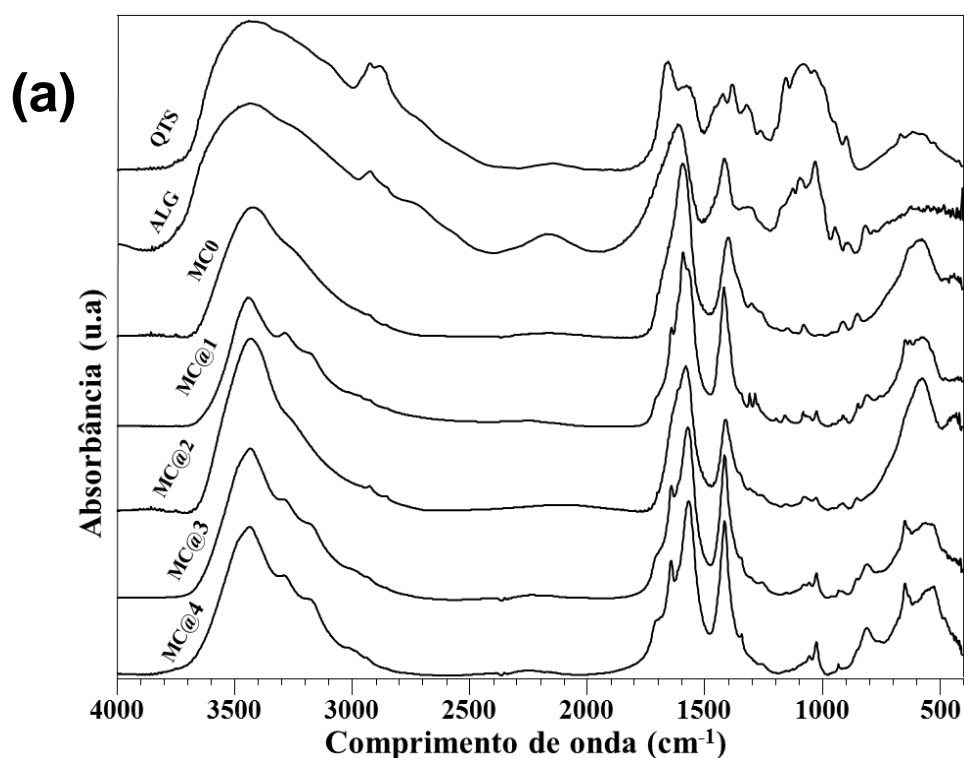
A espectroscopia de FTIR foi utilizada como ferramenta para analisar as principais bandas características dos grupamentos químicos presentes nos polímeros (quitosana e alginato), na curcumina, na amostra MC0, bem como as possíveis interações ocorridas entre estes constituintes na funcionalização das NMPs. Os espectros de FTIR obtidos na faixa de 4000-400 nm para todas as amostras estão representados na Figura 29.

No espectro da amostra MC0 (Figuras 29), observou-se as bandas em aproximadamente 946 e 840 cm^{-1} referente aos estiramentos ν_1 e ν_2 característicos da MnFe_2O_4 ,¹⁴⁸ a banda em 1394 cm^{-1} atribuída as vibrações angulares Fe-O-H na αFeOOH típica da fase goethita, em 1589 cm^{-1} atribuída aos modos assimétricos $\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$ e simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{COOH})$, confirmando a presença de moléculas de citrato adsorvido e, conseqüentemente, que a troca de ligantes na superfície da MnFe_2O_4 foi bem sucedida.¹⁴⁹ Observou-se ainda a banda em 3415 cm^{-1} referente à ligação -OH da água de hidratação e cristalização.

As principais bandas observadas para a quitosana (Figura 29) estão em 1153 cm^{-1} atribuída à ligação C-O-C da glicose β 1-4, em 1257-1377 cm^{-1} referente à ligação C-N, em 1593 cm^{-1} atribuída às vibrações de deformação do

N-H de amina primária, em 1658 cm^{-1} referente à ligação C=O da amida I, em 2877 cm^{-1} relacionada à ligação C-H e em 3363 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação -OH da hidroxila.^{150,151}

Para o alginato (Figura 29), foram observados os picos em 1029 cm^{-1} referente à ligação C-O-C, em 1095 cm^{-1} atribuído à ligação C-OH do álcool cíclico, em 1307 cm^{-1} relacionado à deformação axial da ligação C-O dos grupos carboxílicos, em 1417 e 1616 cm^{-1} atribuídos aos modos simétrico e assimétrico dos grupos -COOH, respectivamente e em 3421 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação -OH.^{150,151}



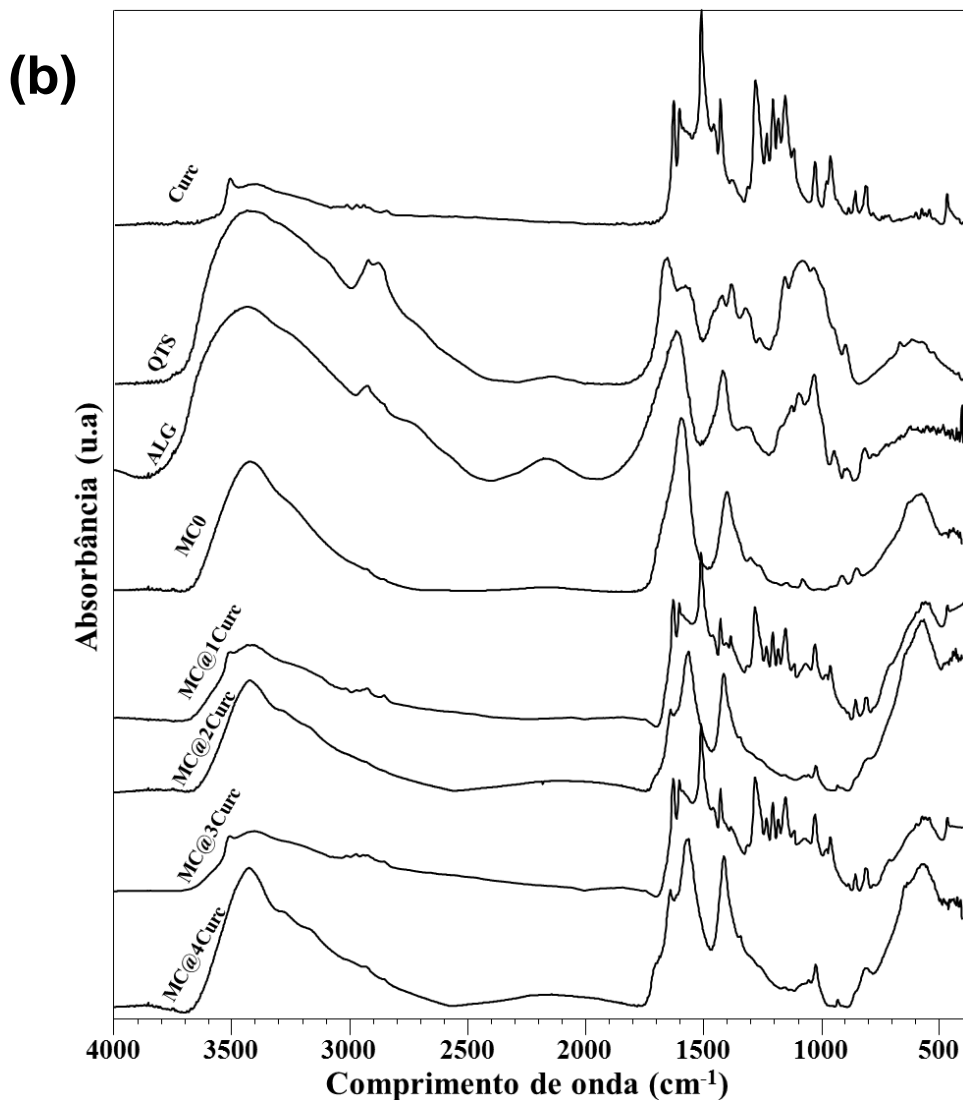


Figura 29 – Espectros de FTIR obtidos para: (a) amostras brancas e (b) amostras contendo curcumina e, seus respectivos constituintes.

As amostras brancas (Figura 29a) também apresentaram as bandas características da $MnFe_2O_4$ em 946 e 840 cm^{-1} , confirmando a interação das NPMs com os grupos de polímeros. Observou-se ainda a banda em 1155 cm^{-1} atribuída à ligação C-O-C da glicemia β 1-4, as vibrações em 1282 - 1305 cm^{-1} relacionadas à ligação C-N, a ligação C=O da amida I localizada em $\sim 1637\text{ cm}^{-1}$ e o estiramento em 1588 cm^{-1} relacionado à ligação N-H do grupo $-NH_3^+$ presente na quitosana. Além disso, foram identificados os picos em 1020 cm^{-1} e 1413 cm^{-1} atribuídos à ligação C-O-C e ao modo vibracional simétrico vs(-COOH), respectivamente, indicando a presença do alginato nas amostras. Os deslocamentos observados nas bandas de absorção dos grupos amina,

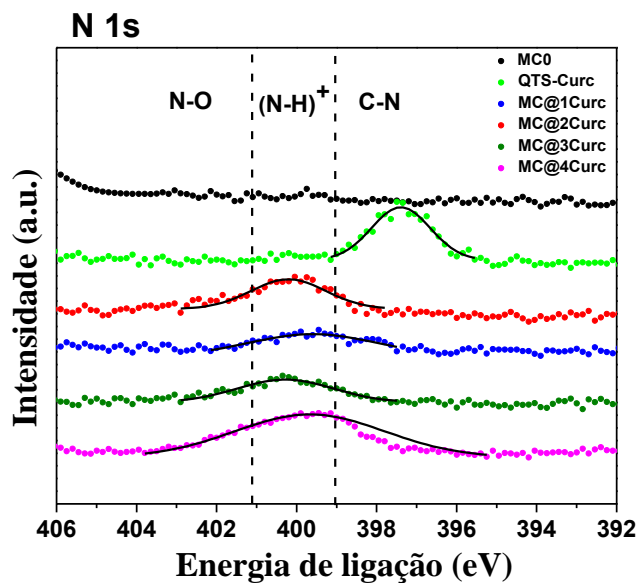
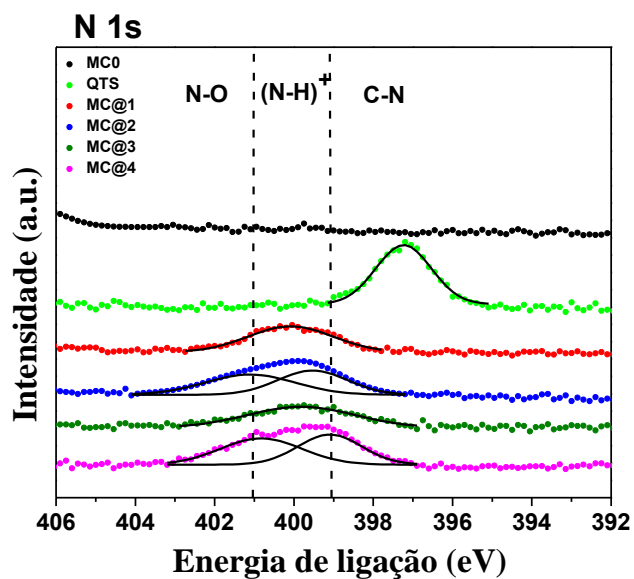
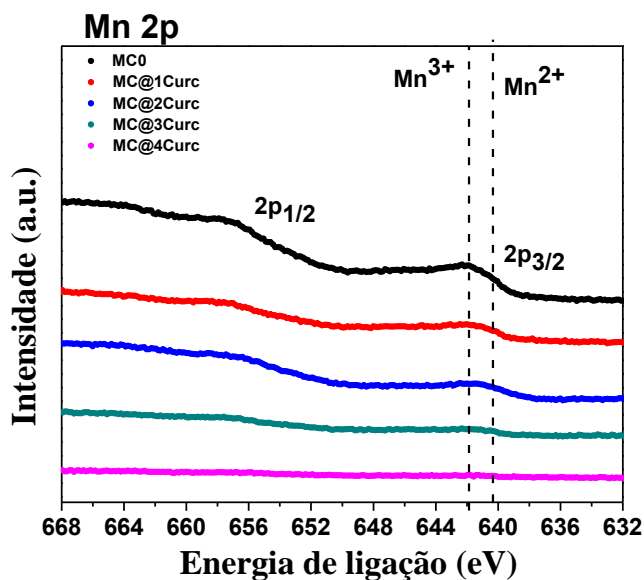
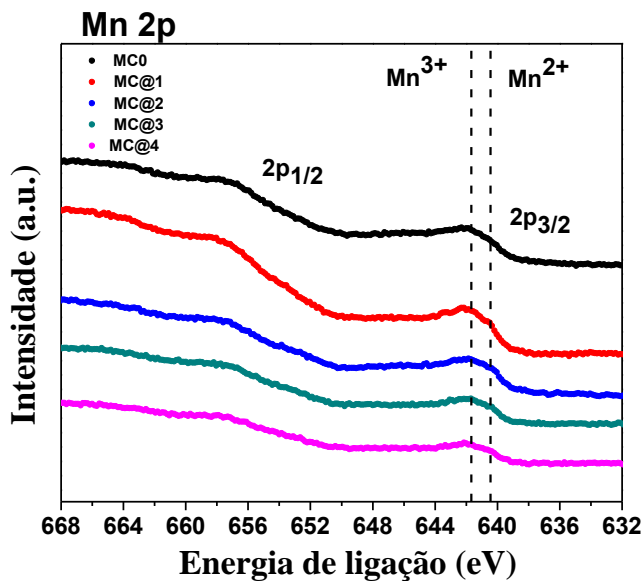
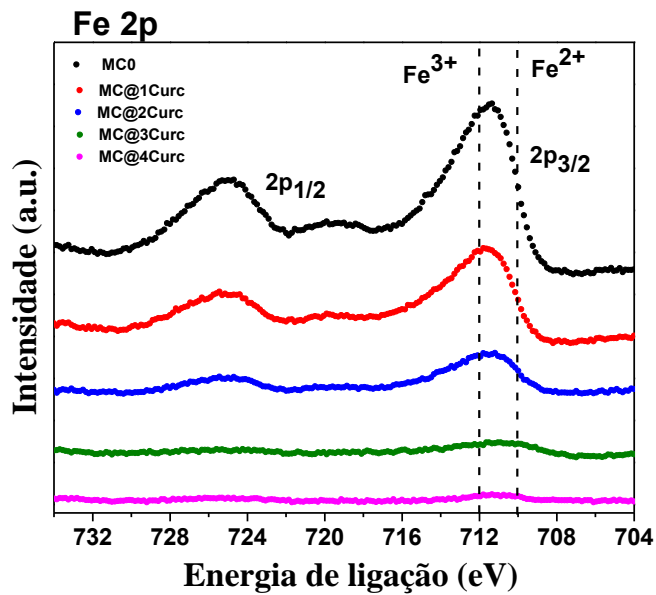
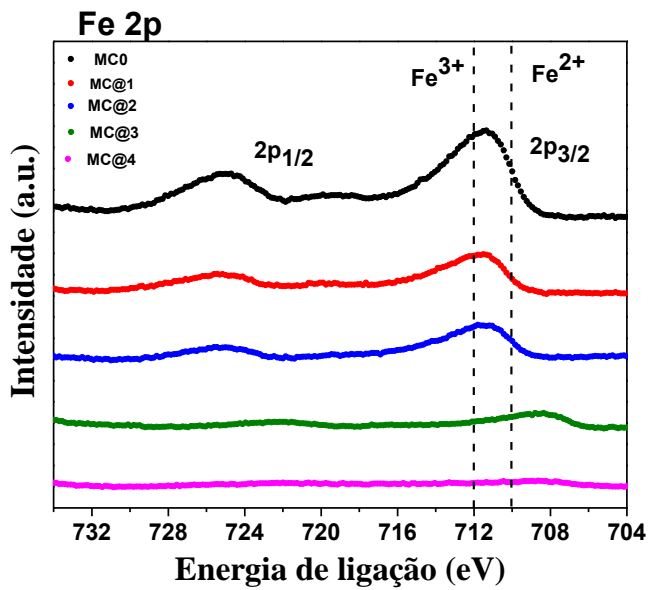
carboxílicos e amida podem ser relacionadas às interações iônicas ocorridas entre o alginato e a quitosana.¹⁵²

A curcumina foi caracterizada pela presença de bandas em 1070 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C–O–C do éter, em 1382 cm^{-1} relacionada ao estiramento dos grupos CH_2 , em 1429-1510 cm^{-1} referente à ligação C=C do anel aromático, em 1629 cm^{-1} atribuída à ligação C=O da cetona conjugada e em 3467 cm^{-1} relacionada à ligação do OH fenólico¹⁵³, conforme observado na Figura 29b.

Além de bandas que confirmam a presença dos polímeros e da ferrita de manganês revestida com citrato, foi possível identificar nos espectros das amostras contendo curcumina (Figura 29b) a banda em 1074 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-O-C do éter, em 1384 cm^{-1} referente à ligação CH_2 , em 1429-1510 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=C do anel aromático e em 1627 cm^{-1} , atribuída à ligação C=O da cetona conjugada, confirmando, assim, a presença do fármaco nas nanoestruturas. Ainda nos espectros das amostras contendo curcumina, observou-se um ligeiro deslocamento dos picos, quando comparados aos seus equivalentes no espectro de curcumina pura, o que indica a interação do corante com quitosana.^{28,153}

4.5.7. Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS)

Com a finalidade de analisar a composição química superficial das amostras funcionalizadas e dos seus respectivos constituintes, bem como as possíveis interações ocorridas entre os polímeros e as NPMs foram adquiridos espectros de XPS de alta resolução para os elementos: O 1s, N 1s, Fe 2p e Mn 2p na região correspondente à energia de ligação do C 1s (285 eV). Os espectros obtidos para todas as amostras estão representados na Figura 30.



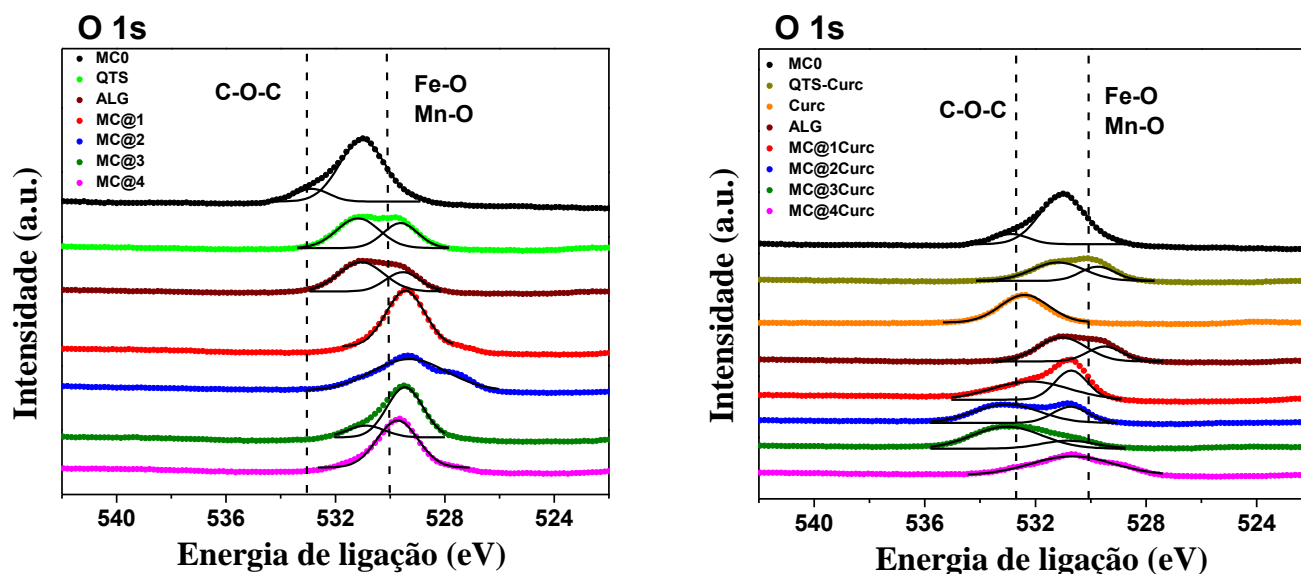


Figura 30 – Espectros de XPS obtidos para as amostras funcionalizadas e seus respectivos constituintes.

Nos espectros de Fe 2p foi possível confirmar as energias de ligação em 710,0 eV e 712,0 eV relacionadas aos picos Fe 2p_{2/3} e Fe 2p_{1/2}. Já nos espectros de Mn 2p identificou-se os picos Mn 2p_{3/2} em 642,0 eV e Mn 2p_{1/2} em 655,0 eV.¹¹⁸

Os espectros de N 1s obtidos a partir de amostras em vários estágios da modificação da superfície foram deconvoluídos em três picos na faixa de energia de ligação de 392-406 eV. Assim, o pico em 401,3 eV corresponde a energia de ligação de N-H⁺ devido à presença da quitosana, enquanto o pico a 404,3 eV refere-se ao grupo N-O e indica a interação entre quitosana e alginato.¹⁵² Além disso, observou-se uma componente em 399,5 eV referente à energia de ligação do grupo C-N, que indica a interação entre NH₂ de quitosana e a curcumina.¹⁵⁴

Nos espectros de O 1s, observou-se os picos em 532,4 eV e 530 eV correspondentes as energias de ligação dos grupos C-O-C, Fe-O e Mn-O. Ainda nos espectros de O 1s é possível notar também diferenças entre as amostras, pois apesar de serem ajustados com o mesmo número de componentes, com menor largura de linha, ocorreu um ligeiro deslocamento dos máximos para energias menores em algumas amostras. Do efeito, não foi observada a componente centrada em torno de 536,6 eV relacionada à

presença de umidade na superfície das amostras, indicando que o processo de secagem resultou na decomposição ou evaporação da água adsorvida.¹⁵⁵

Nos espectros de XPS cada pico de energia de ligação foi decomposto em um número de componentes apropriadas às possíveis ligações presentes nas amostras até alcançar o melhor ajuste. Desta forma, a Tabela 6 apresenta os valores dos máximos de cada componente do pico de energia de ligação analisado e as concentrações dos elementos em porcentagem atômica (% at) para todas as amostras funcionalizadas e seus respectivos constituintes.

Tabela 6 – Composição química da superfície em (% at) obtida por XPS para as amostras funcionalizadas e seus constituintes.

Amostras	Fe (% at)	Mn (% at)	O (% at)	N (% at)	C (% at)	Na (% at)
MC0	3,3	0,3	43,6	-	52,6	0,2
Quitosana	-	-	39,7	5,8	54,5	-
QTS-Curc	-	-	44,9	4,9	50,2	-
Curcumina	-	-	39,7	-	60,3	-
Alginato	-	-	32,4	-	50,0	17,6
MC@1	2,9	0,3	41,0	5,8	33,8	16,2
MC@2	2,6	0,2	40,9	3,6	38,4	14,3
MC@3	2,0	0,1	35,7	2,1	36,6	23,5
MC@4	1,8	0,1	29,1	1,9	34,3	32,8
MC@1Curc	2,8	0,3	50,9	5,7	38,1	2,2
MC@2Curc	2,1	0,2	51,6	4,3	39,9	1,9
MC@3Curc	1,9	0,2	45,1	3,2	41,4	8,2
MC@4Curc	1,2	0,1	41,2	1,8	40,4	15,3

Na composição da amostra MC0 além de O, Fe e Mn observou-se a presença de C e Na (52,6 e 0,2%, respctivamente), que pode ser atribuído ao ácido cítrico, utilizado para modificar a superfície da $MnFe_2O_4$ e ao citrato de sódio, utilizado para ajustar o pH da amostra. Já a composição química obtida para a QTS e para o ALG está de acordo com os dados obtidos na análise de XPS realizada por *Rodrigues et al.*¹⁵⁶.

Nas amostras brancas e contendo curcumina foram identificados apenas os elementos presentes nas estruturas dos seus precursores, indicando a ausência de contaminação durante o processo de deposição das camadas de polímeros. A presença de curcumina nas amostras foi ainda confirmada com base no aumento da relação de massa atômica de O/C nas amostras contendo curcumina MC@1Curc (1,33), MC@2Curc (1,29), MC@3Curc (1,09) e

MC@4Curc (1,02), quando comparado às amostras brancas MC@1 (1,21), MC@2 (1,06), MC@3 (0,98) e MC@4 (0,84).

Foi possível observar ainda uma redução na intensidade dos picos nos espectros de Fe 2p e Mn 2p e um aumento na intensidade dos picos nos espectros de N 1s à medida que as camadas de polímeros foram depositadas na superfície das NPMs, corroborando com a análise realizada por FTIR, que mostra a eficiência na funcionalização das NPMs com polímeros e a encapsulação da curcumina.

4.5.8. Análise Termogravimétrica (TGA)

Na Figura 31 estão representadas as curvas de TGA obtidas para NPMs funcionalizadas com polímeros e seus respectivos constituintes.

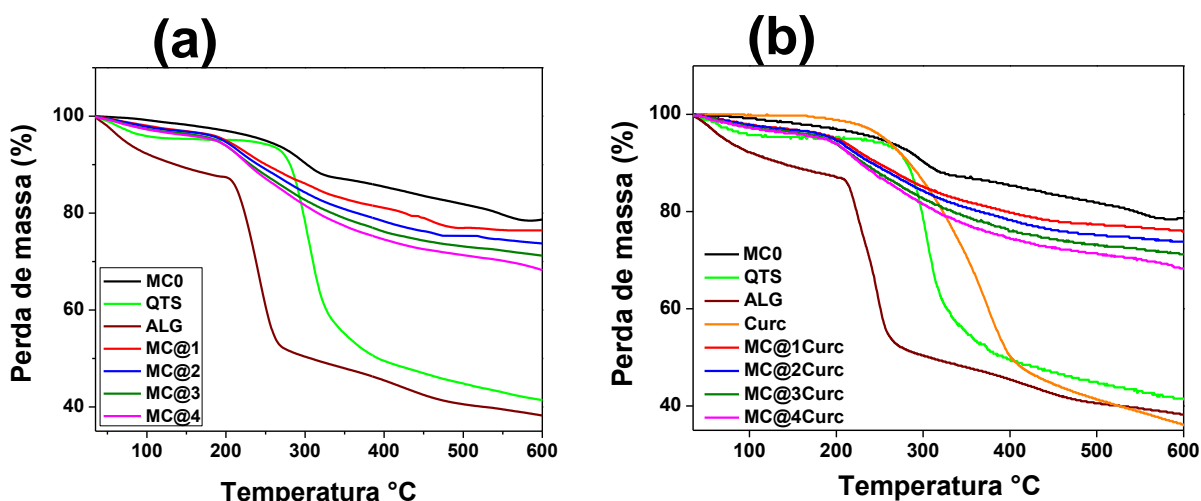


Figura 31 - Análise termogravimétrica obtida para: (a) amostras brancas e (b) amostras contendo curcumina e, seus respectivos constituintes.

Para a amostra MC0 (Figura 31), observou-se dois estágios de perda de massa, resultando em uma degradação máxima de 17,1 %. O primeiro no intervalo de 35 à 320°C referente à perda de água e o segundo de 320 à 600°C atribuído à degradação de moléculas de citrato ligadas à superfície das NPMs.¹⁵⁷

A curva de TGA obtida para a quitosana (Figura 31) exibe um comportamento típico para este polissacarídeo, apresentando dois estágios distintos, resultando em uma perda de massa máxima de 58,2 %. O primeiro estágio foi observado no intervalo de 35 à 217°C, que corresponde à perda de

moléculas de água associadas aos grupos amina e hidroxilas do polímero por meio de ligações de hidrogênio. Já o segundo ocorreu no intervalo de 217 a 600°C atribuída à degradação térmica, que tem início com a quebra aleatória de ligações glicosídicas, seguida da decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana.¹⁵⁸

Para o alginato de sódio (Figura 31) observou-se três perfis de perda de massa, sendo o primeiro no intervalo de 35 a 177°C atribuído à perda de moléculas de água. O segundo no intervalo de 177 a 320°C correspondente à degradação do alginato de sódio em carbonato de sódio (Na_2CO_3); e o terceiro estágio, no intervalo de 320 a 600°C referente à decomposição do carbonato de sódio em óxido de sódio (Na_2O).¹⁵⁹ A degradação máxima observada nas curvas de alginato foi de 60,8 %.

Na curva de TGA obtida para a curcumina (Figura 31b) detectou-se também três estágios com perda de massa máxima de 54,7 %. O primeiro ocorreu no intervalo de 35 a 191°C, correspondendo à perda de moléculas de água e o segundo e terceiro nos intervalos de 191 a 437°C e 437 a 600°C, respectivamente, referentes à decomposição da curcumina.²⁷

As NPMs revestidas com polímeros exibiram dois estágios de perda de massa (Figura 31a). O primeiro correspondente à evaporação de água livre e quimicamente ligada, e o segundo relacionado à decomposição térmica do material orgânico depositado na superfície das NPMs.¹⁴⁹ Por conseguinte, como também observado em outro estudo,²⁸ as amostras revestidas com polímeros apresentaram maior estabilidade térmica, quando comparadas aos seus constituintes puros, pois foi necessário uma temperatura mais elevada para a degradação do material orgânico.

Para as amostras contendo curcumina (Figura 31b), foi observado comportamento semelhante, no entanto, nestas amostras, a degradação dos biopolímeros foi deslocada para temperaturas mais baixas, quando comparadas com amostras sem curcumina. Isso indica a presença de um material intercalado, ou seja, a curcumina, que reduz a estabilidade térmica do revestimento polimérico.

A perda de massa máxima obtida por TGA para todas as amostras sintetizadas está listada na Tabela 7, na qual se observou um aumento da perda de massa da amostra MC@1 para MC@4, confirmando a sucessiva

deposição de QTS e ALG na superfície das NPMs. No entanto, por TGA não foi possível estimar quantitativamente com precisão a relação NPMs/polímero, uma vez que os polímeros não foram totalmente degradados no intervalo de temperatura analisado.

Tabela 7 – Perda de massa obtida por TGA e porcentagem de MnFe₂O₄ obtida por ICP-OES.

Amostra	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Perda de massa (% m/m) ^c	MnFe ₂ O ₄ (% m/m)
	T ₁ ^a	P ₁ ^b	T ₂ ^a	P ₂ ^b	T ₃ ^a	P ₃ ^b		
MC0	35-320	7,7	320-600	9,4			17,1	81,6
Quitossana	35-217	4,9	217-600	53,3			58,2	
Alginato	35-177	11,8	177-320	38,1	320-600	10,9	60,8	
Curcumina	35-191	0,7	191-437	53,6	437-600	0,4	54,7	
MC@1	35-174	3,7	174-600	19,4			23,1	73,7
MC@2	35-195	3,7	195-600	22,8			26,5	71,3
MC@3	35-180	4,5	180-600	24,9			29,4	35,3
MC@4	35-191	4,6	191-600	27,0			32,5	32,5
MC@1Curc	35-173	3,6	173-600	20,5			24,1	73,2
MC@2Curc	35-171	6,2	171-600	20,8			27,0	71,3
MC@3Curc	35-171	4,2	171-600	24,6			28,8	66,9
MC@4Curc	35-171	4,3	171-600	25,7			30,0	35,8

^a Intervalo de temperatura de máxima velocidade de degradação, °C.

^b Porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação.

^c Perda de massa em % à 600°C.

Ainda na Tabela 7, observa-se as porcentagens de massa da MnFe₂O₄ estimadas a partir de medições por ICP-OES. Os dados de ICP-OES mostram que houve um aumento na perda de polímero na amostra MC@1 (26,3 % m/m) para 67,5 % m/m após a quarta interação com polímeros. Os resultados indicam que à medida que aumenta a camada de polímero depositada na superfície das NPMs, a relação de massa de NPMs/polímero diminui, concordando qualitativamente com os dados obtidos por TGA, e com a hipótese de um procedimento de revestimento bem sucedido.

4.5.9. Medidas de magnetização

Nas curvas de magnetização (M), à temperatura ambiente, em função do campo magnético aplicado (H), obtidas para a amostra MC0 antes e após os sucessivos revestimentos com polímeros foi observado um comportamento superparamagnético em concordância com a ausência de magnetização remanente e coercitividade, mesmo após a retirada do campo magnético, conforme Figura 32 e Tabela 8.

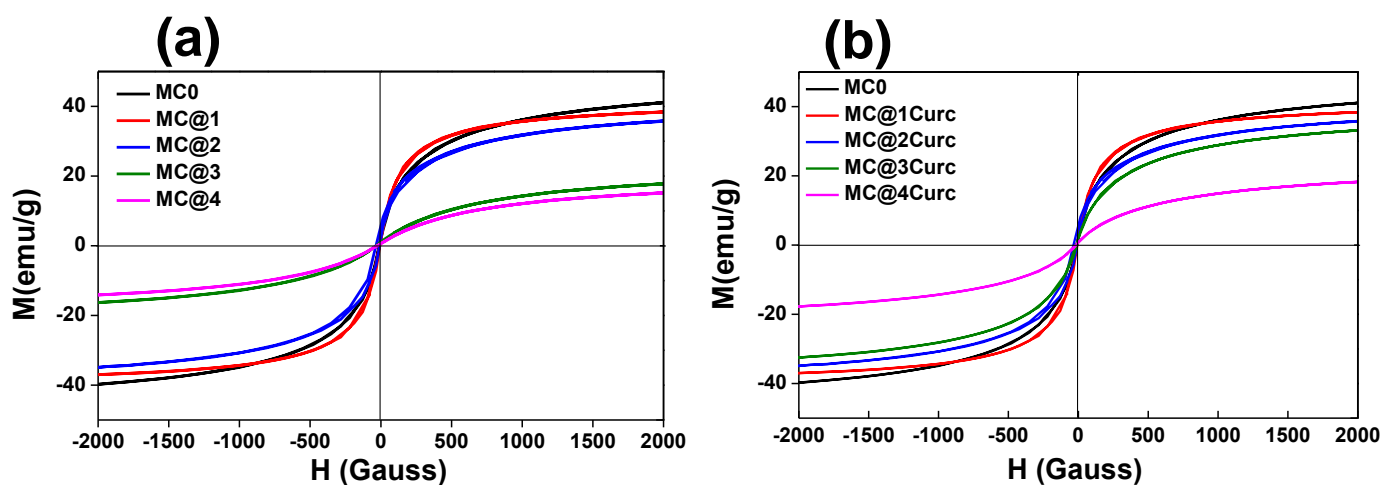


Figura 32 – Curvas de magnetização de saturação obtidas para: (a) amostras brancas e (b) amostras contendo curcumina.

Tabela 8 – Valores de magnetização de saturação obtidos para as amostras brancas e contendo curcumina.

Amostra	Valores de magnetização (emu/g)
MC0	41,1
MC@1	38,0
MC@2	35,8
MC@3	17,4
MC@4	15,3
MC@1Curc	37,6
MC@2Curc	35,8
MC@3Curc	33,1
MC@4Curc	18,5

Para a amostra MC0, observou-se que a magnetização de saturação, determinada no campo magnético máximo aplicado, foi de 41,1 emu/g. No entanto, ao descontar a massa de citrato, o valor de magnetização obtido ($MS \sim 48,0$ emu/g) é inferior ao valor em massa da ferrita de manganês (57,1

emu/g)¹⁶⁰. Essa redução no valor de MS da amostra pode estar relacionada à massa do citrato ligado na superfície da $MnFe_2O_4$ ^{161,162}, que afetam as propriedades magnéticas das partículas.

Ainda na Tabela 8, detectou-se que o valor da magnetização de saturação das NPMs revestidas com polímeros diminui com o aumento da camada de polímero depositada na superfície da amostra MC0, indicando que o núcleo magnético da $MnFe_2O_4$ foi revestido com camadas crescentes de material diamagnético¹⁵⁸, neste caso QTS e ALG.

Estes resultados corroboram a eficácia da técnica de LbL, afirmando com precisão que a espessura do revestimento polimérico no substrato de nanopartículas não prejudica sua propriedade magnética. Este é um tópico chave na hipertermia magnética para aplicações de liberação de fármaco assistida por magneto, já que o aumento da relação material “não-magnético”/magnético no nanossistema poderia prejudicar sua resposta ao aplicar um campo magnético alternado. Assim, neste trabalho, escolhemos apenas quatro camadas de polímeros para revestir as NPMs com a finalidade de limitar a magnetização do nanossistema polimérico-magnético a cerca de 50% (no máximo) em relação à magnetização das NPMs sem revestimento.

Concomitantemente, a baixo campo e regime diluído, o parâmetro de interação dipolar γ pode ser relacionado à susceptibilidade magnética inicial $\chi_0 = \partial M/\partial H$ por meio da expressão de Langevin descrita como: $\gamma = 3\chi_0$.¹⁶³ Desta forma, a partir de dados experimentais, a estimativa dos valores de γ mostrou um regime de interação dipolar mais baixa na amostra MC@4 ($\gamma \sim 1,0$), quando comparada à amostra MC0 ($\gamma \sim 3,0$), concordando com os resultados obtidos por MET, que apresentaram NPMs homogêneas dispersas em uma fase de polímero. Para as amostras contendo curcumina foi observado um comportamento magnético semelhante (Figura 32b). Contudo, seus valores de magnetização de saturação (Tabela 8) foram ligeiramente inferiores aos obtidos para as amostras brancas, indicando também a presença de uma massa extra não magnética (curcumina) nas amostras.

Tais resultados podem ter implicações relevantes na liberação controlada/assistida de fármacos por meio de NPMs, já que a distância superfície-superfície das nanopartículas é um parâmetro importante que

modula a hipertermia magnética, melhorando, assim, a amplitude de suas aplicações neste campo.¹⁶⁴ Não obstante, isso ainda pode ter uma contribuição importante em aplicações não convencionais de hipertermia magnética, como, por exemplo, na reciclagem controlada remotamente de nanosorventes magnéticos durante o tratamento de água contendo poluentes.¹⁶⁵

4.6. Caracterização da curcumina

4.6.1. Comportamento espectroscópico da curcumina

A curcumina é considerada um ácido fraco, que apresenta três valores de pKa estimados (8,38; 9,88 e; 10,51)¹⁶⁶ correspondentes aos três equilíbrios ácido-base, conforme observado na Figura 33. Em meio aquoso a curcumina permanece nas formas ceto e enol e normalmente se converte na forma enol em outros solventes.¹⁷⁴ Todavia, dependendo do pH do meio, a curcumina exibe estrutura, cor e comprimento de onda máximo diferenciados.²²

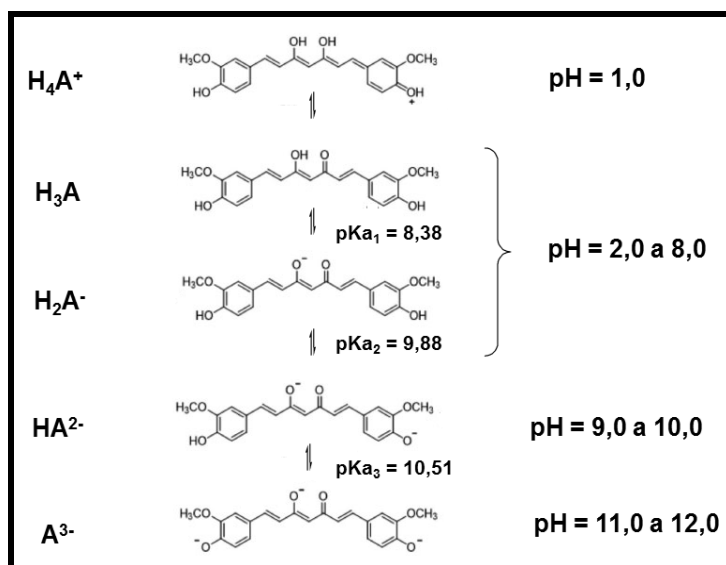


Figura 33 – Equilíbrios ácido-base da curcumina. (Adaptada de: Sueth-Santiago et al.²²).

Assim, com o intuito de entender melhor as mudanças no comportamento da curcumina em diferentes pHs, foram realizadas medidas espectroscópicas, cujos resultados estão ilustrados na Figura 34.

Com base nos espectros de UV-Vis (Figura 34a) foi possível observar que o corante apresenta valor de λ_{max} igual a 429 nm em valores de pH 2,0 a

8,0. Em pH 9,0, após o primeiro valor de pKa do corante observa-se um ligeiro deslocamento do λ_{max} para 432 nm. Já em pH 10,0, próximo ao seu segundo valor de pKa, observou-se um deslocamento significativo no λ_{max} do corante para 445 nm, devido a mudança em sua estrutura. Finalmente, nos pH 11,0 e 12,0, em que a curcumina está completamente desprotonada e com coloração avermelhada, observou-se que o seu λ_{max} atingiu valores de 457 nm e 462 nm, respectivamente. Ainda nos espectros de UV-Vis, detectou-se um ligeiro aumento na intensidade de absorbância em pHs mais alcalinos. Isto se deve também as formas desprotonadas da curcumina, que apresentam maior absorvidade molar.¹⁶⁷

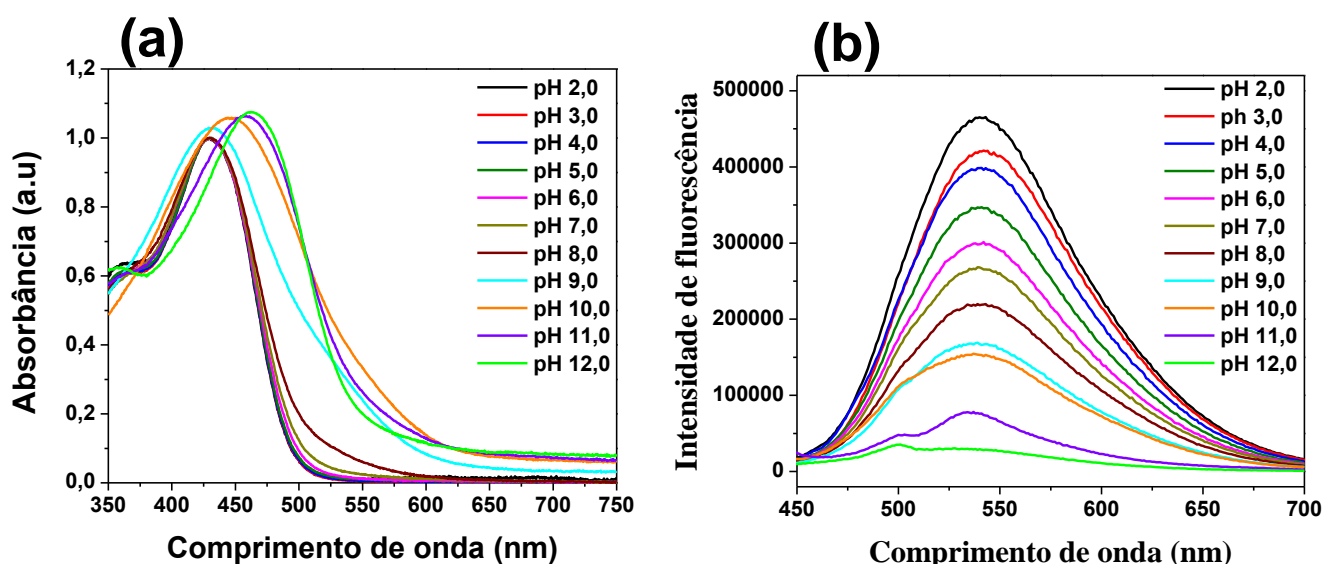


Figura 34 – Comportamento da curcumina em diferentes pHs observado por: (a) Espectroscopia de UV-Vis e (b) Espectroscopia de fluorescência.

Nos espectros de fluorescência da curcumina em diferentes pHs (Figura 34b), verificou-se que em toda faixa de pH o λ_{emi} foi de 540 nm. Entretanto, à medida que se aumentou o pH, ocorreu uma redução na intensidade de fluorescência a 540 nm (banda enólica), o que pode ser devido à degradação da curcumina em pH básico.¹⁶⁷ Conseqüentemente, à medida que o meio se tornou básico surgiu um pico em torno de λ_{emi} 500 nm nos espectros de fluorescência. Isto também pode ser atribuído à degradação do corante em meio alcalino, levando à formação de outros compostos aromáticos menores.¹⁶⁸

4.6.2. Curva de calibração da curcumina

Embora a curcumina seja mais solúvel em soluções alcalinas e neutras, nesta faixa de pH as velocidades de degradação hidrolítica do corante são relativamente rápidas, tornando-o instável, pois à medida que se aumenta o pH para valores neutro ou alcalino, o próton do grupamento fenólico é removido, levando à destruição da estrutura dieno conjugada da molécula de curcumina.¹⁶⁷

Desse modo, neste estudo, a análise de eficiência de encapsulação e o perfil de liberação da curcumina foi realizada em pHs nêtro e ácido, já que em pHs inferiores aos valores de pKa da curcumina, há maior estabilidade, devido à manutenção da estrutura dieno conjugada da molécula. No entanto, antes das análises, foram construídas as curvas de calibração da curcumina (Figura 35) nas respectivas misturas.

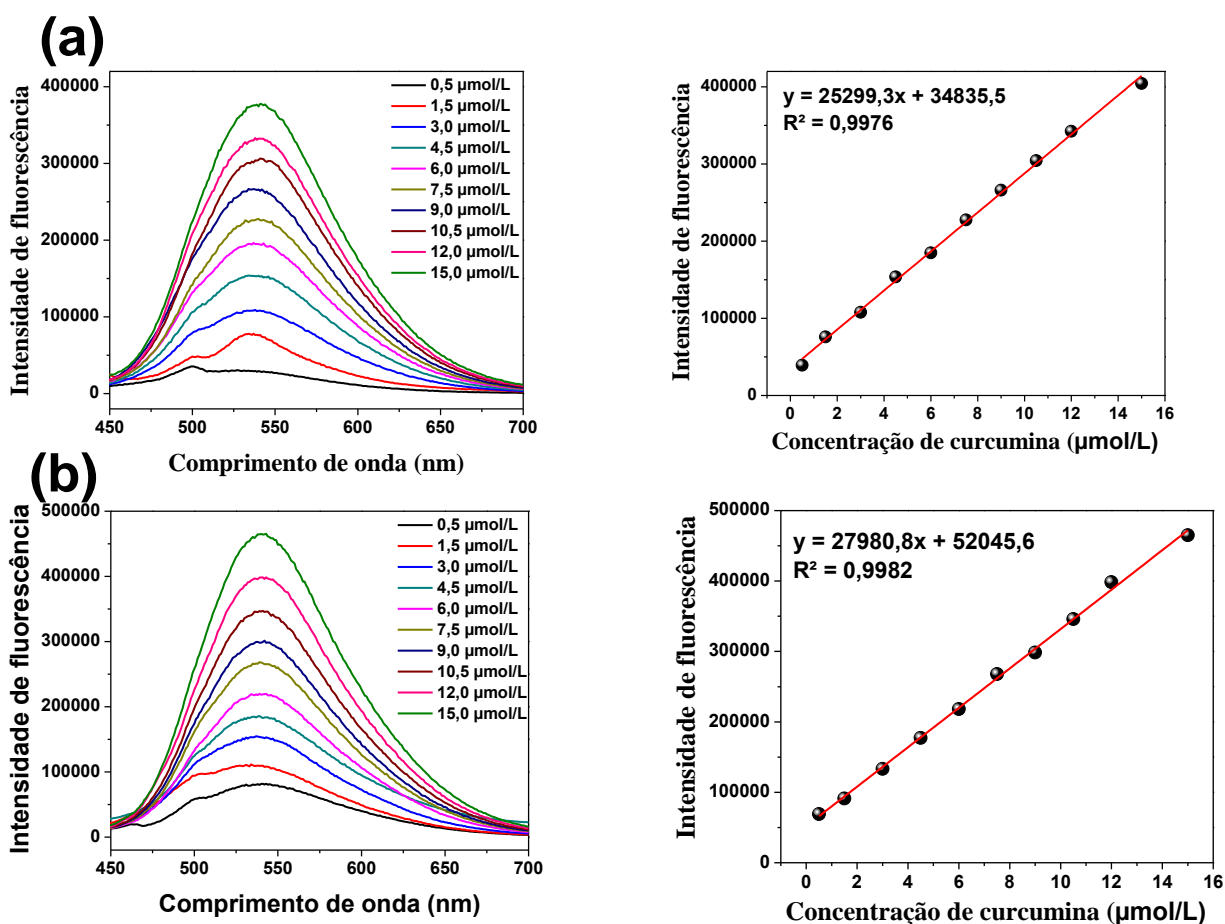


Figura 35 – Curvas de calibração obtidas para a curcumina preparada em: (a) solução 0,1 mol/L de NaH₂PO₄ a pH 7,4:etanol, e (b) solução 0,1 mol/L de HCl a pH 1,2:etanol.

Com base na equação da reta e nos valores de coeficiente de correção (R^2) obtidos, pôde-se observar que ambas as curvas apresentaram linearidade e boa correlação entre os pontos.

4.7. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da curcumina

4.7.1. Validação do método

Os espectros de emissão representativos da solução de 15,0 $\mu\text{mol/L}$ de curcumina e das amostras brancas, obtidos sob as condições de fluorescência especificadas no item 3.2.8.1 estão apresentados na Figura 36. O espectro da curcumina apresenta uma banda de emissão intensa na região de comprimento de onda de 450-700 nm, exibindo uma fluorescência máxima em λ_{emi} 540 nm. Já nos espectros das amostras brancas, não foi detectada nenhuma interferência das nanopartículas no λ_{emi} 540 nm sob as condições fluorimétricas empregadas, garantindo, desta forma, a especificidade do método.

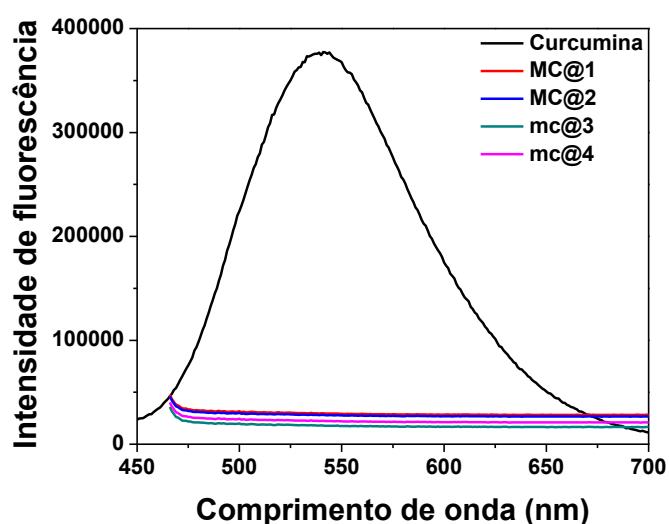


Figura 36 – Espectro de fluorescência obtido para a curcumina e para as amostras brancas.

A linearidade como resposta do detector foi calculada a partir da média de três curvas de calibração da curcumina na faixa de concentração de 0,5 a 15,0 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 35). A partir da equação da reta média verificou-se a linearidade no intervalo de 0,5 a 15,0 $\mu\text{mol/L}$, com um coeficiente de correlação de 0,9976. A validade do ensaio foi confirmada por meio de análises

de variância (ANOVA), a qual demonstrou que a equação de regressão linear foi significativa ($P < 0,05$) e o desvio da linearidade não significativo.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) calculado para o método foi de 0,2 e 14,6 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, indicando que o método é suficientemente sensível para ser usado para determinar a eficiência de encapsulação do fármaco.

A exatidão foi calculada a partir da determinação de três medidas das suspensões de amostras brancas contaminadas com curcumina. Para este parâmetro não foram observadas diferenças significativas entre a quantificação de curcumina adicionada e a quantidade de curcumina encontrada, indicando exatidão do método. Os resultados de exatidão e precisão intradia e interdia também estão discriminados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados de exatidão e precisão obtida com o método de quantificação desenvolvido.

	MC@1	MC@2	MC@3	MC@4
Concentração ($\mu\text{mol/L}$)	Recuperação^a \pm DPR (%)	Recuperação^a \pm DPR (%)	Recuperação^a \pm DPR (%)	Recuperação^a \pm DPR (%)
0,5	101,3 \pm 0,6	96,0 \pm 0,7	98,0 \pm 0,4	95,3 \pm 0,2
6,0	97,7 \pm 0,3	99,3 \pm 0,7	99,4 \pm 0,7	96,5 \pm 0,3
12,0	99,7 \pm 0,4	99,1 \pm 0,6	99,5 \pm 0,3	99,8 \pm 0,9
	Recuperação \pm DPR (%)	Recuperação \pm DPR (%)	Recuperação \pm DPR (%)	Recuperação \pm DPR (%)
Precisão interdia ^a Dia 1	98,8 \pm 0,1	94,2 \pm 0,3	98,0 \pm 0,3	97,1 \pm 0,2
Dia 2	94,7 \pm 0,3	98,8 \pm 0,4	98,7 \pm 0,2	95,1 \pm 0,1
Dia 3	99,5 \pm 0,4	98,7 \pm 0,1	98,9 \pm 0,4	99,2 \pm 0,9
Precisão intradia ^a	97,7 \pm 1,6	97,2 \pm 1,9	98,5 \pm 1,7	97,1 \pm 1,5

^a análise realizada em triplicata, n = 3.

Os teores de curcumina encontrados nos três diferentes dias foram equivalentes ($P < 0,05$) e os valores de desvio padrão relativo estão dentro do critério de aceitação de 5,0 %, demonstrando a precisão do método.

4.7.2. Determinação da eficiência de encapsulação

Com base nos resultados da avaliação da eficiência de encapsulação obtidos para a curcumina (Tabela 10), registrou-se que houve maior eficiência de encapsulação da curcumina nas amostras MC@1Curc e MC@3Curc, onde é realizada a adição do fármaco durante o revestimento com quitosana. Tais

resultados podem ser associados ao efeito cumulativo e ao aumento da relação de massa de biopolímero/NPMs à medida que o número de camadas aumenta. Observa-se ainda que ocorreu uma pequena perda de curcumina da amostra MC@1Curc para a amostra MC@2Curc e da amostra MC@3Curc para a amostra MC@4Curc. Isto se deve, provavelmente, ao processo de lavagem realizado para remover o material polimérico em excesso.

Tabela 10 – Eficiência de encapsulação, quantidade de curcumina e recuperação obtidos a partir das amostras contendo curcumina.

Amostra	Eficiência de encapsulação (%EE) ^a	Quantidade de curcumina (µg/mg) ^a	Recuperação ^a ± DPR (%)
MC@1Curc	68,1 ± 1,9	102,2 ± 2,8	103,2 ± 0,8
MC@2Curc	64,3 ± 2,9	96,5 ± 4,3	100,5 ± 0,2
MC@3Curc	78,2 ± 2,4	117,8 ± 3,6	98,7 ± 0,4
MC@4Curc	72,7 ± 2,5	109,0 ± 3,8	100,4 ± 0,7

^a análise realizada em triplicata, n = 3.

Utilizando a espectroscopia de fluorescência, *Mazzarino et al.*¹⁶⁹, quantificaram a curcumina encapsulada em nanopartículas de quitosana-policaprolactona. Os autores relataram a encapsulação de ~60 µg de curcumina por mg de nanopartículas com eficiência de encapsulação >99 %. *Manju et al.*³⁴, montaram conjugados catiônico/aniônico de curcumina de poli (vinilpirrolidona)/ácido hialurônico em nanopartículas magnéticas. A quantidade de curcumina encapsulada neste nanossistema, determinada por espectroscopia de UV-Vis foi ~30 µg de curcumina por mg de nanopartículas. *Das et al.*¹⁷⁰, também utilizaram a espectroscopia de UV-Vis para quantificar a curcumina encapsulada em nanopartículas de quitosana-alginato-plurônico obtendo uma eficiência de encapsulação de ~13%,. A alta eficiência do encapsulação de curcumina nos nanossistemas sintetizados neste trabalho parece ser provavelmente devida a uma eficiente estratificação de curcumina intercalada nas camadas de polímeros no núcleo magnético.

4.8. Estudo de liberação controlada/assistida *in vitro* da curcumina

Estudos reportam que a liberação controlada de fármacos por meio de diferentes sistemas de liberação pode ocorrer como resposta a estímulos

específicos, tais como: campos elétricos ou magnéticos, exposição a ultrassom, luz, enzimas, sacarídeos ou antígenos e alterações no pH, temperatura ou estado redox.¹⁴⁷ Assim, neste estudo, a liberação controlada *in vitro* da curcumina por meio das nanopartículas polimérico-magnética foi avaliada, utilizando-se os estímulos de pH, temperatura e campo magnético (hipertermia magnética).

4.8.1. Estímulo de pH e temperatura

As curvas de liberação cumulativa da curcumina a partir das nanopartículas polimérico-magnéticas em diferentes pHs e temperaturas durante o período de 240 h (Figura 37) mostram claramente a diferença no perfil de liberação da curcumina causada pelo aumento da temperatura nas duas faixas de pH.

O aumento de temperatura gera um aumento do grau de agitação das moléculas de um sistema, o que resulta em uma liberação mais acelerada do fármaco. Na temperatura de hipertermia (43 °C) são necessárias apenas 1h e 9h para liberação de ~60% do fármaco encapsulado nas amostras MC@1Curc e MC@4Curc, respectivamente. Em contrapartida, na temperatura de 25 °C são necessárias aproximadamente 7h e 48h para a amostra MC@1Curc atingir 60% de liberação nos pHs 7,4 e 1,2, respectivamente, e 120h para que a amostra MC@4Curc libere 60% de curcumina em ambos os pHs. Na temperatura de 37 °C observou-se um perfil de liberação da curcumina moderado. Para todas as amostras, observou-se que a meia vida de liberação ($t_{1/2}$), ou seja, o tempo necessário para que 50% do fármaco encapsulado seja liberado, foi reduzida em ~3 vezes no pH 7,4 e em ~4 vezes no pH 1,2, quando a temperatura foi elevada de 25 °C para 43 °C.

Para todas as amostras, observou-se que a meia vida de liberação ($t_{1/2}$), ou seja, o tempo necessário para que 50% do fármaco encapsulado seja liberado, foi reduzida em ~3 vezes no pH 7,4 e em ~4 vezes no pH 1,2, quando a temperatura foi elevada de 25 °C para 43 °C.

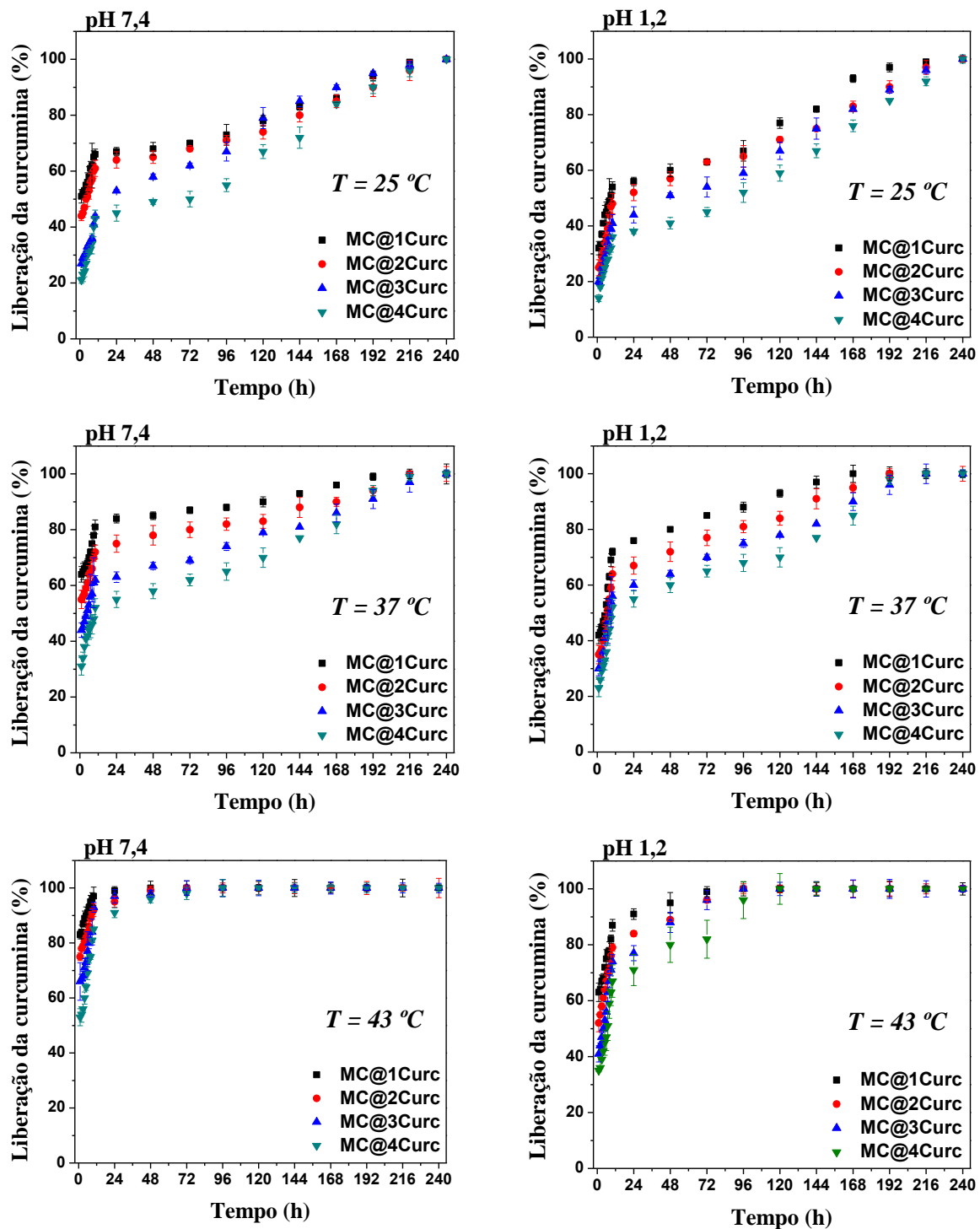


Figura 37 – Perfil de liberação da curcumina por meio das NPMs funcionalizadas obtido a partir do estímulo de pH e de temperatura.

De maneira similar, o aumento do pH do meio resulta em um aumento significativo da liberação da curcumina em todas as amostras analisadas. Isto é, em pH 7,4, a liberação do corante ocorreu de forma mais acelerada, quando comparado ao pH 1,2.

Em pH 7,4, os grupos amina da quitosana ($pK_a = 6,3$) não se encontram ionizados, enquanto que os grupos carboxílicos do alginato ($pK_a = 3,3$) e os grupos fenólicos da curcumina ($pK_a = 8,3$) estão desprotonados. Assim, há um aumento na densidade de cargas negativas, resultando em uma repulsão eletrostática do tipo ânion-ânion entre os grupos carboxílicos do alginato e fenólicos da curcumina. Esta repulsão eletrostática, associada à redução da força de interação entre a quitosana e o alginato, desestabiliza as camadas poliméricas depositadas na superfície das NPMs.^{171,172} Como consequência, as moléculas de curcumina associadas às camadas de polímeros adquirem maior mobilidade, facilitando assim sua liberação para o meio.

Em valores de pH mais baixos, especialmente a pH 1,2, quase todos os grupos amino da quitosana estão completamente protonados e os grupos carboxílicos e fenólicos do alginato e da curcumina, respectivamente, não estão ionizados. A presença de grupos positivamente carregados provoca a repulsão eletrostática entre as cadeias da quitosana e, também, a solvatação desta, o que deveria permitir uma maior liberação da curcumina. No entanto, isto não ocorre devido ao equilíbrio de ionização dos grupos funcionais dos polímeros e da curcumina, que favorece a formação de ligações de hidrogênio entre a QTS e o ALG.^{171,172} Esta forte ligação faz com que as camadas poliméricas permaneçam estáveis, dificultando a liberação da curcumina.

Vários modelos matemáticos foram desenvolvidos e estudados para entender a cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação.¹⁷³ Neste estudo, foram aplicados os modelos de Korsmeyer-Peppas e Gallagher-Corrigan, a fim de elucidar o mecanismo pelo qual a curcumina é liberada a partir das amostras polimérico-magnéticas. A escolha do modelo foi baseada no valor do coeficiente de correlação (R^2) mais alto (superior a 0,9750)¹⁷⁴, já que este é um indicador do melhor ajuste. Os resultados obtidos para cada modelo estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Resultados obtidos para liberação da curcumina, utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas.

		T = 25 °C			T = 37 °C			T = 43 °C		
	Amostras	k	n	R ²	k	n	R ²	k	n	R ²
pH 1,2	MC@1Curc	0,17	0,21	0,9268	0,20	0,16	0,7437	0,25	0,06	0,8587
	MC@2Curc	0,14	0,25	0,8989	0,17	0,25	0,8218	0,23	0,09	0,9642
	MC@3Curc	0,12	0,25	0,9504	0,16	0,27	0,8995	0,20	0,17	0,9450
	MC@4Curc	0,08	0,27	0,9461	0,13	0,29	0,9008	0,18	0,23	0,8181
pH 7,4	MC@1Curc	0,23	0,07	0,8595	0,26	0,05	0,8522	0,28	0,05	0,8973
	MC@2Curc	0,21	0,14	0,8881	0,24	0,05	0,8164	0,27	0,05	0,9632
	MC@3Curc	0,14	0,22	0,9243	0,21	0,13	0,8788	0,26	0,03	0,9578
	MC@4Curc	0,12	0,22	0,9147	0,18	0,18	0,9463	0,23	0,08	0,8990

Tabela 12 – Resultados obtidos para liberação da curcumina, utilizando o modelo de Gallagher-Corrigan.

		pH 1,2					pH 7,4				
	Amostras	f _B	k ₁	k ₂	t _{max}	R ²	f _B	k ₁	k ₂	t _{max}	R ²
25 °C	MC@1Curc	0,14	0,26	0,012	142,8	0,9783	0,11	0,38	0,007	77,0	0,9752
	MC@2Curc	0,18	0,18	0,014	193,1	0,9764	0,13	0,33	0,007	129,4	0,9829
	MC@3Curc	0,14	0,16	0,015	166,1	0,9775	0,13	0,18	0,013	136,8	0,9750
	MC@4Curc	0,12	0,15	0,018	169,4	0,9763	0,13	0,11	0,016	162,4	0,9609
37 °C	MC@1Curc	0,25	0,17	0,011	192,4	0,9752	0,14	0,28	0,004	0	0,9909
	MC@2Curc	0,23	0,16	0,012	194,7	0,9784	0,13	0,27	0,005	52,3	0,9907
	MC@3Curc	0,21	0,15	0,013	193,2	0,9824	0,13	0,21	0,007	119,2	0,9886
	MC@4Curc	0,20	0,14	0,018	194,5	0,9758	0,15	0,20	0,012	166,8	0,9844
43 °C	MC@1Curc	0,19	0,19	0,005	18,7	0,9948	0,18	1,31	0,012	0	0,9891
	MC@2Curc	0,22	0,18	0,010	118,1	0,9929	0,17	0,61	0,011	0	0,9839
	MC@3Curc	0,26	0,15	0,018	112,9	0,9787	0,23	0,15	0,004	195,8	0,9894
	MC@4Curc	0,26	0,12	0,024	131,9	0,9764	0,28	0,15	0,005	229,9	0,9885

Com base no valor do coeficiente de correlação mais alto (Tabelas 11 e 12), os dados dos experimentos de liberação da curcumina realizadas em pH 1,2 e 7,4 e em diferentes temperaturas foram melhor ajustados ao modelo de Gallagher-Corrigan. Além disso, o modelo de Gallagher-Corrigan aproximou os pontos experimentais de liberação da curcumina melhor do que o modelo de Korsmeyer-Peppas, conforme observado na Figura 38.

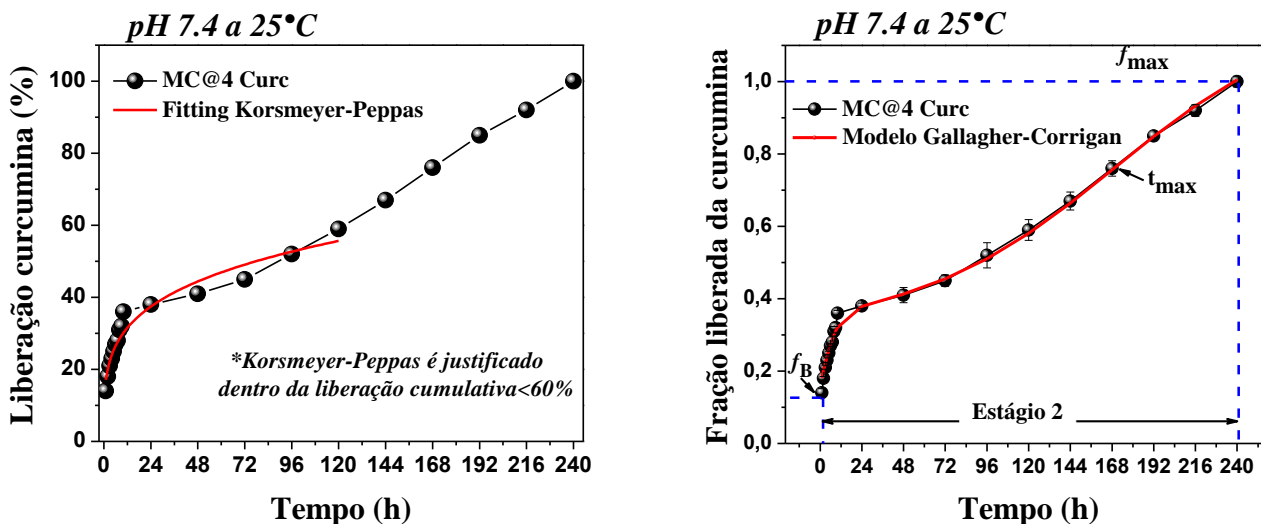


Figura 38 – Representação do *fitting* obtido para a amostra MC@4Curc com a aplicação de modelos matemáticos.

Com base no modelo de Gallagher–Corrigan, pode-se dizer que a cinética de liberação da curcumina, a partir do nanossistema polimérico magnetoresponsivo, ocorreu em um processo de dois estágios, gerando duas constantes de liberação k_1 e k_2 . O primeiro estágio reflete à dissolução da curcumina para o meio, controlada por difusão e pela solubilidade do fármaco (k_1). Já no segundo estágio, a taxa de liberação da curcumina depende da degradação do polímero no decorrer do tempo (k_2).⁹⁶

É evidente que as constantes k_1 e k_2 desempenharam um papel inversamente proporcional no processo de liberação da curcumina, isto é, à medida que se aumenta o número de camadas de polímeros k_1 diminui enquanto que k_2 aumenta, independente da temperatura e do pH.

A redução em k_1 pode ser atribuída ao menor intumescimento à medida que aumenta as camadas de polímeros, que leva a uma redução no volume médio de poros, dificultando, desta forma, a difusão da curcumina para o meio.¹⁷⁴ Já o aumento em k_2 está relacionado à degradação dos polímeros, isto é, na amostra MC@4Curc a degradação dos polímeros é maior que na amostra MC@1Curc, facilitando, desta forma, a rápida liberação da curcumina para o meio.

4.8.2. Estímulo de campo magnético (hipertermia magnética)

É notório que as nanopartículas magnéticas podem dissipar certa quantidade de calor quando submetidas a um campo magnético externo – a hipertermia magnética.¹⁷⁵ Assim, a proposta desse trabalho foi utilizar esse calor, gerado remotamente por um estímulo magnético, para promover a liberação da curcumina encapsulada no nanossistema polimérico-magnético para o meio de aplicação.

No entanto, há vários fatores que podem afetar a capacidade de dissipação térmica dos sistemas magnéticos, como por exemplo, a composição, o diâmetro, a forma, a agregação, a magnetização e concentração das NPMs e o tipo e quantidade de material utilizado para modificar a superfície das NPMs, dentre outros.¹⁷⁵

Neste sentido, foram realizados experimentos controles com os constituintes do nanossistema polimérico-magnético desenvolvido neste estudo, a fim de avaliar se estes interferem na capacidade de aquecimento das NPMs após o revestimento de sua superfície, quando submetidas a um campo magnético alternado. Os experimentos controles foram realizados também com a finalidade de estabelecer as condições ideais para o estudo de liberação da curcumina, e os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 39.

A Figura 39a mostra o comportamento da amostra MC0 que aquece por hipertermia magnética quando submetida a diferentes campos magnéticos (CMAs), na frequência de 326 kHz, durante o intervalo de tempo de 900 s. Na Figura 39d observa-se ainda que os polímeros e a curcumina isolados não sofrem mínima interação com o campo magnético máximo (190 Oe) na frequência de 326 kHz, durante o período de 900 s, indicando, desta forma, que o aquecimento gerado pelas amostras brancas (Figura 39b) nas mesmas condições de análise foi decorrente do processo de hipertermia magnética induzida pelo núcleo magnético de nanopartículas de ferrita.

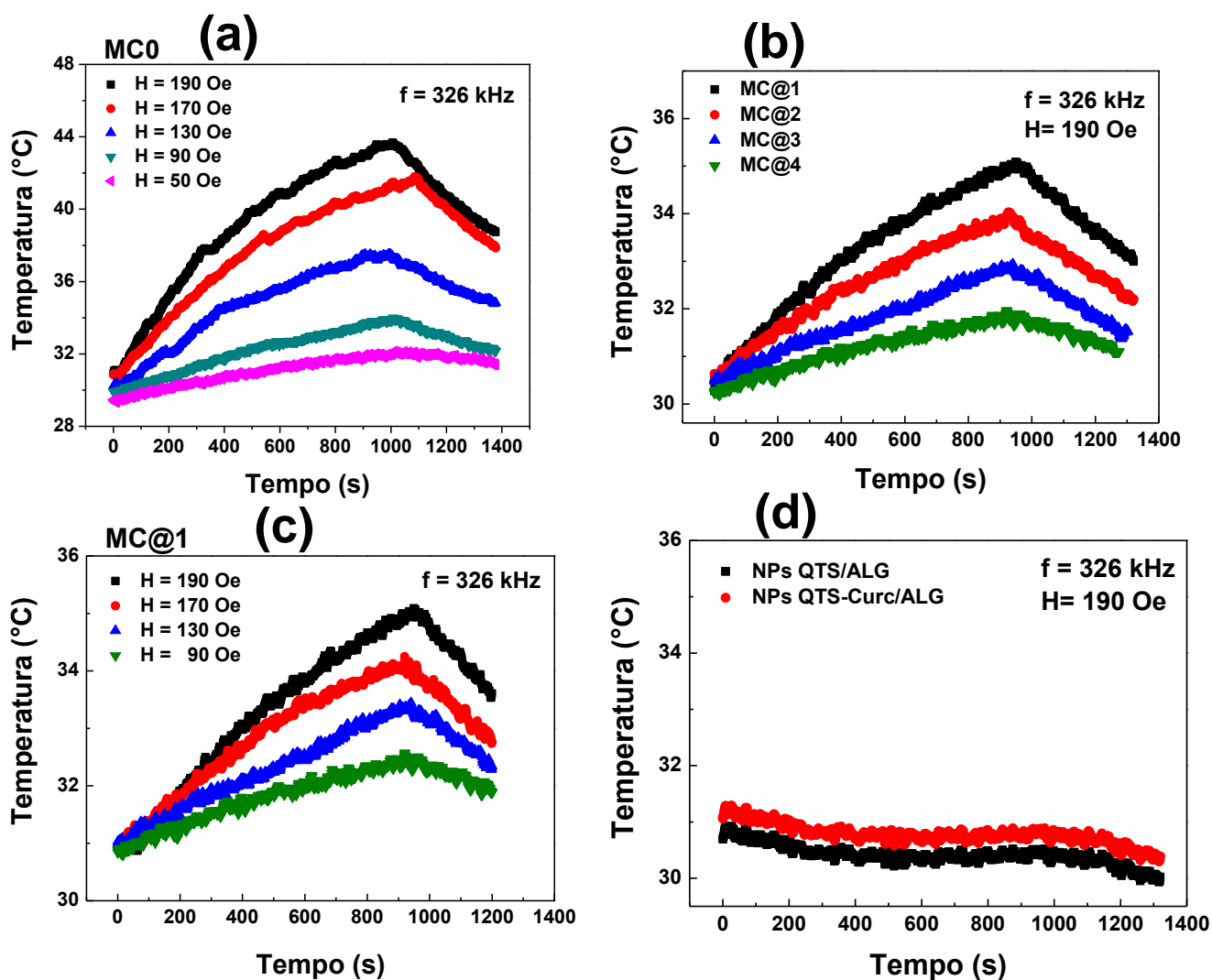


Figura 39 – Variação de temperatura em função do tempo obtida para as amostras MC0, amostras brancas, QTS/ALG e QTS-Curc/ALG submetidas a um campo magnético alternado.

Sabendo-se que a amostra MC0 antes e após o revestimento com os polímeros apresentou um comportamento superparamagnético, pode-se inferir que o aquecimento gerado pelas NPMs (Figura 39) ocorreu devido à rotação do momento magnético no interior da partícula (relaxamento de Néel) ou à rotação do momento magnético juntamente com a rotação das partículas inseridas em um meio líquido em direção ao campo magnético aplicado, sendo esta rotação promovida pela fricção do líquido (relaxamento Brown) ou ainda pela combinação destes dois mecanismos de aquecimento.

Vale ainda ressaltar que, de fato, a redução nos valores de *MS* e de concentração da ferrita de manganês obtidos por medidas de magnetização e ICP-OES à medida que aumentou a camada de polímero na superfície da amostra MC0 exerceu uma forte contribuição na capacidade de aquecimento

das NPMs após o revestimento. Isto é, a amostra MC@1, que possui um valor de *MS* de 38,0 emu/g e uma concentração de 73,7 % (m/m) de MnFe_2O_4 aqueceu aproximadamente 5 vezes mais que a amostra MC@4 com valor de *MS* de 15,3 emu/g e concentração de 32,5 % (m/m) de ferrita de manganês, conforme observado na Figura 39b.

Na Figura 39c, pode-se observar que a amostra MC@1 (maior concentração de MnFe_2O_4) apresentou maior capacidade de aquecimento no campo magnético máximo de 190 Oe, na frequência de 326 kHz, durante o período de 900 s e que nestas mesmas condições os polímeros isolados não possuem capacidade de aquecimento. Nesse sentido, as condições estabelecidas para os experimentos de liberação da curcumina foram: Frequência de 326 kHz (comumente utilizada em testes biológicos *in vitro* e *in vivo*), campo magnético de 190 Oe e tempo de 900 s. O estudo de liberação da curcumina foi realizado em triplicata, sendo as amostras coletadas a cada 180 s e, posteriormente, analisadas por espectroscopia de fluorescência nas condições descritas no item 3.2.9.2. Os resultados obtidos para a liberação da curcumina após a aplicação do campo magnético estão ilustrados na Figura 40.

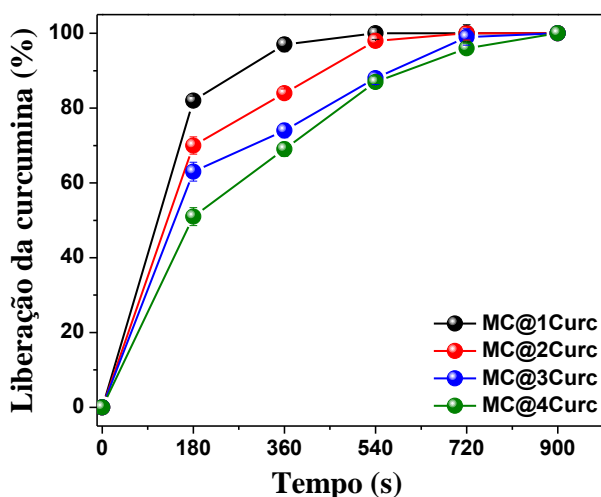


Figura 40 – Perfil de liberação da curcumina a partir das NPMs polimérico-magnéticas obtido após a aplicação do campo magnético.

Conforme informado no item 3.2.9.2, a taxa de liberação da curcumina obtida por hipertermia magnética foi comparada com a curva de calibração do corante obtida em solução 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 a pH 7,4:etanol. Desta forma, ao comparar a liberação da curcumina antes e após a aplicação do campo magnético no pH 7,4, e na temperatura de 43 °C, constatou-se que a liberação

da curcumina ocorreu de forma mais acelerada após a aplicação do campo magnético. Para a amostra MC@1Curc, por exemplo, foi necessário 1 h para a liberação de ~80 % de curcumina (Figura 37), enquanto que esta mesma porcentagem de curcumina foi liberada em apenas 180 s após a aplicação do campo magnético (Figura 40). Isso pode ser justificado pelo efeito magnetocalorífico das nanopartículas, que induz a geração e transferência de calor para as camadas poliméricas, provocando um aumento da temperatura, localmente, que leva a uma alteração na estrutura conformacional do polímero ou até mesmo o rompimento de sua estrutura, resultando na rápida difusão da curcumina para o meio.

A fim de entender melhor o mecanismo de liberação da curcumina a partir das NPMs funcionalizadas, aplicou-se o modelo matemático de liberação de primeira ordem proposto por Ritger-Peppas (Equação 1). O resultado obtido após o ajuste das curvas de liberação está ilustrado na Figura 41.

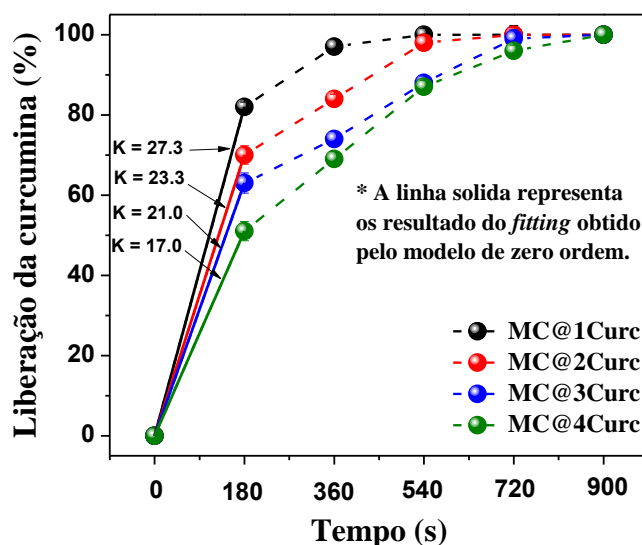


Figura 41 – Representação do *fitting* obtido para as amostras contendo curcumina com a aplicação do modelo matemático de primeira ordem.

O modelo de primeira ordem baseia-se em uma equação de uma linha reta, em que a constante de liberação k é obtida a partir da inclinação da reta. Assim, a partir do *fitting* realizado até 180 s de liberação para todas as amostras (Figura 41), observa-se que a amostra MC@1Curc apresentou uma inclinação da reta maior que a amostra MC@4Curc. Este aumento na inclinação da reta pode ser atribuído a maior velocidade de liberação da

curcumina a partir da amostra MC@1Curc, o que concorda com os valores de k , que decrescem à medida que aumenta a camada de polímero.

4.9. Testes biológicos

4.9.1. Avaliação da atividade citotóxica

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade das NPMs funcionalizadas e da curcumina livre em células tumorais humana de mama (MCF-7) no período de 72h de incubação. Os resultados obtidos estão representados na Figura 42 e Tabela 13.

A viabilidade celular da curcumina livre e nanoencapsulada (Figura 42) foi significativamente reduzida ($P < 0,0001$), apresentando uma atividade citotóxica dose-dependente, com o aumento da concentração de curcumina de 40 a 100 $\mu\text{mol/L}$.

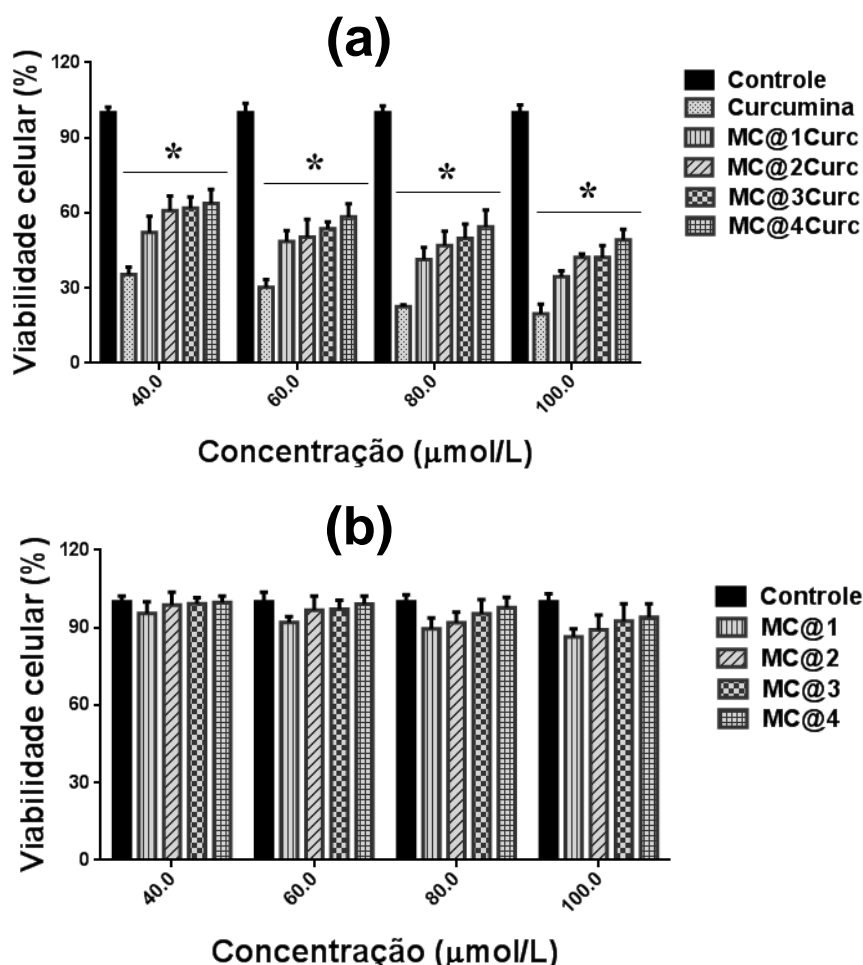


Figura 42 - Porcentagem de viabilidade celular das células MCF-7 na presença de: (a) curcumina livre e nanoencapsulada e (b) amostras brancas. Significativamente diferente do controle: * $P < 0,0001$.

Tabela 13 - Viabilidade celular obtida para as células MCF-7 nas diferentes concentrações da curcumina livre, amostras brancas e amostras contendo curcumina no período de 72 horas.

Amostras	Concentração ($\mu\text{mol/L}$)			
	40 ^a	60 ^a	80 ^a	100 ^a
Controle	100 \pm 0,3	100 \pm 1,1	100 \pm 0,5	100 \pm 0,8
Curcumina	35,4 \pm 3,0	30,3 \pm 3,1	22,5 \pm 0,8	19,7 \pm 3,8
MC@1	95,5 \pm 4,5	92,1 \pm 2,2	89,5 \pm 4,2	84,4 \pm 4,1
MC@2	98,8 \pm 4,9	96,7 \pm 3,5	91,9 \pm 1,8	87,2 \pm 3,7
MC@3	99,3 \pm 2,3	97,1 \pm 3,5	95,4 \pm 2,5	90,6 \pm 2,6
MC@4	99,8 \pm 2,4	99,1 \pm 2,2	97,8 \pm 3,9	94,1 \pm 3,1
MC@1Curc	52,2 \pm 3,5	48,6 \pm 4,3	41,4 \pm 4,8	34,6 \pm 2,3
MC@2Curc	60,9 \pm 3,9	50,3 \pm 3,1	47,0 \pm 2,7	42,2 \pm 1,4
MC@3Curc	61,9 \pm 4,5	53,7 \pm 2,8	49,8 \pm 4,8	42,3 \pm 3,6
MC@4Curc	63,8 \pm 3,6	58,4 \pm 3,3	54,5 \pm 0,7	49,2 \pm 4,3

^a análise realizada em triplicata, n = 3.

Ao comparar os resultados obtidos com o controle (células não tratadas), observou-se que a curcumina livre provocou uma redução de 35,4 a 18,7 % na viabilidade das células MCF-7. Já a adição das amostras MC@1Curc, MC@2Curc, MC@3Curc e MC@4Curc resultou em uma redução de 52,2 a 34,6 %, 60,9 a 42,2 %, 61,9 a 42,3 % e 63,8 a 49,2 %, respectivamente, na viabilidade celular à medida que a concentração de curcumina aumentou, conforme visualizado na Figura 42a e Tabela 13.

Ainda na Figura 42a, observou-se que na amostra MC@1Curc houve uma maior redução na viabilidade celular em todas as concentrações estudadas, quando comparadas com a amostra MC@4Curc. Isto pode ser atribuído ao aumento de camadas de polímero biocompatíveis na superfície da amostra MC0, o que diminui a citotoxicidade do núcleo magnético e dificulta a imediata disponibilidade da curcumina para o meio biológico, conforme observado nos estudo de liberação da curcumina.

De fato, espera-se que a interação com o meio biológico da curcumina livre e nanoencapsulada seja diferente, uma vez que a via de absorção celular das nanopartículas é diferente daquela exibida pelos fármacos livres¹⁷⁶, enquanto a curcumina livre tem contato direto com a célula facilitando sua difusão a membrana¹⁷⁷, a curcumina nanoencapsulada, penetra na célula por endocitose¹⁷⁸ e a droga é liberada gradualmente para o meio, levando a uma

redução no efeito citotóxico. No entanto, vale ressaltar que as nanopartículas podem ser acumuladas em regiões tumorais que apresentam vascularização anormal e baixa drenagem linfática (efeito de permeabilidade aprimorada e retenção - EPR). Ao se acumular na área de interesse, estes nanossistemas não devem apenas liberar gradualmente uma quantidade elevada do fármaco no sítio alvo, mas também minimizar os efeitos colaterais nos tecidos normais e, como resultado, diminuir a toxicidade sistêmica.¹⁷⁹

Nos experimentos realizados para avaliar a citotoxicidade das amostras brancas (Figura 42b), observou-se que, apesar da degradação gradual parcial dos polímeros (QTS e ALG), a biocompatibilidade do sistema de liberação não foi comprometida, uma vez que não demonstraram redução significativa na viabilidade das células MCF-7 no período de 72h em qualquer concentração testada.

O potencial terapêutico da curcumina como agente citotóxico tem sido amplamente estudado nos últimos anos. Vários estudos mostram que a curcumina possui perfis de citotoxicidade distintos, dependendo do tecido celular e sua concentração.¹⁸⁰ Em relação ao câncer de mama humano, estudos realizados por *Mascarella et al.*³³, *Bayomi et al.*¹⁸¹, *Boztas et al.*¹⁸² e *Zhi-Dong et al.*¹⁸³, ao avaliar a atividade citotóxica da curcumina livre e nanoencapsulada, utilizando células tumorais humana de mama MCF-7 também obtiveram perfis de viabilidade celular similares aos obtidos neste estudo.

4.9.2. Estudo da internalização das amostras nas células MCF-7

Observações no microscópio eletrônico de transmissão (Figura 43) mostraram que após 6h de exposição houve a internalização das amostras (curcumina livre e MC@3Curc) no citoplasma, nas vesículas e dentro do núcleo das células MCF-7, apresentando, desta forma, sinais de citotoxicidade.

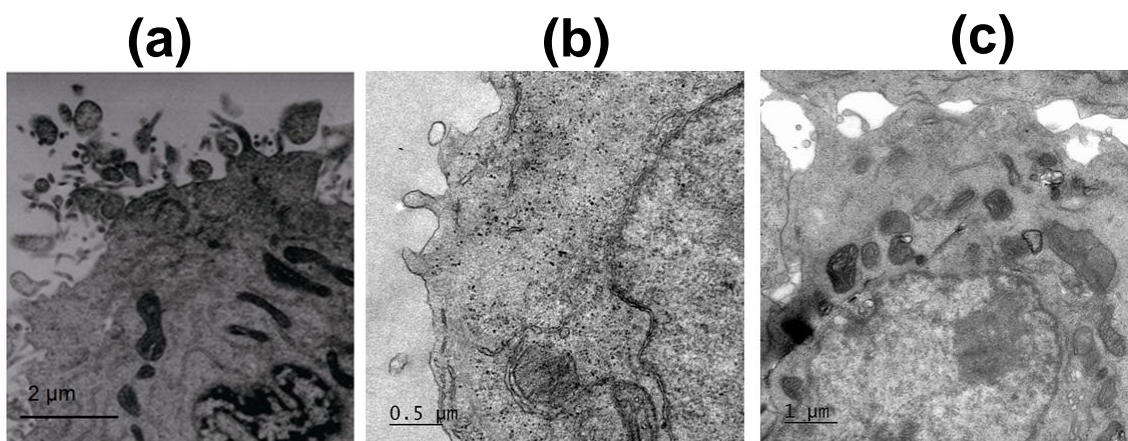


Figura 43 - Micrografias eletrônicas de transmissão obtidas para as células MCF-7 expostas a 100 µmol/L de: (a) Curcumina livre (escala = 2 µm), (b) amostra MC@3Curc (escala = 0,5 µm) e, (c) células MCF-7 não tratadas (escala = 1 µm) durante o período de 6h.

As principais alterações ultra-microestruturais em todos os grupos tratados foram: agregação da cromatina, desnaturação mitocondrial, autofagia e formação de corpos apoptóticos, assim como compartimentos citoplasmáticos, inchaço e desaparecimento do cristato mitocondrial. Estudos anteriores¹⁸⁴ demonstraram a internalização de nanopartículas magnéticas com diâmetros semelhantes a das NPMs obtidas neste estudo e de curcumina livre em MCF-7.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

5.1. Conclusão

O uso da técnica de deposição LbL em conjunto com o estudo de especiação permitiu a obtenção de um sistema *multicore*, baseado em NPMs de MnFe_2O_4 revestidas com quitosana e alginato de sódio para encapsulação da curcumina, com diâmetro hidrodinâmico de ~200 nm, distribuição estreita, morfologia heterogênea e comportamento superparamagnético, possibilitando sua aplicação em hipertermia magnética.

Por conseguinte, o nanossistema polimérico magnetoresponsivo apresentou um sinal de inversão do potencial zeta entre positivo e negativo (± 30 mV) de acordo com o pH do meio e com as propriedades catiônicas/aniônicas dos polímeros depositados na superfície das NPMs, indicando a eficiência no revestimento da superfície das NPMs com os polímeros e a estabilidade das amostras em solução aquosa.

A funcionalização das NPMs com polímeros foi ainda confirmada por meio de titulação potenciométrica e condutimétrica simultâneas, BET, FTIR, XPS, TGA e ICP-OES.

O método analítico, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência, desenvolvido para determinar a eficiência de encapsulação da curcumina em solução 0,1 mol/L de tampão NaH_2PO_4 a pH 7,4:etanol, apresentou linearidade, especificidade, exatidão e precisão, resultando na encapsulação de ~100 μg de curcumina por mg de nanopartícula.

A liberação *in vitro* da curcumina foi conduzida em diferentes pHs e temperaturas, sendo observado uma liberação mais rápida do corante na solução de pH 7,4 e na temperatura de 43°C. Em todas as amostras foi observado que a cinética de liberação da curcumina ocorreu em um processo de dois estágios (dissolução controlada por difusão e liberação mais lenta decorrente da degradação dos polímeros), seguindo o modelo de liberação de Gallagher-Corrigan.

Na liberação da curcumina por hipertermia magnética, verificou-se uma liberação mais acelerada do fármaco, quando comparado a liberação por estímulos de pH e de temperatura. Neste estudo ficou evidenciado que a capacidade magnetocalorífica das NPMs de MnFe_2O_4 citratadas induzem a

transferência de calor para as camadas poliméricas, provocando um aumento da temperatura local, que resulta no rompimento na estrutura do polímero e, conseqüentemente, na difusão da curcumina para o meio, seguindo o modelo de liberação de primeira ordem.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* da curcumina livre e da nanoencapsulada, utilizando a linhagem de célula tumoral humana de mama (MCF-7), mostraram uma redução significativa ($P < 0,001$) na viabilidade de células MCF-7, apresentando uma atividade citotóxica dose-dependente. Além do mais, foi observado que o revestimento com polímeros aumentou a biocompatibilidade das NPMs em meio biológico.

De fato, a rota de síntese, proposta neste estudo permitiu a elaboração bem sucedida de um nanossistema multifuncional, baseado em polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, com modulação da carga superficial, propriedades magneto-térmicas e alta eficiência de encapsulação da curcumina. Este nanossistema é, portanto, uma ferramenta potencialmente remota e não invasiva para uma variedade de aplicações biológicas que utilizam o efeito da hipertermia, incluindo, principalmente para a liberação de substâncias hidrofóbicas, como a curcumina.

5.2. Perspectivas

Como sugestão para continuidade deste trabalho propõe-se:

- I. Melhorar a estabilidade coloidal e a capacidade magnetocalorífica do nanossistema polimérico magnétoresponsivo para que tenha maior eficiência na hipertermia magnética;
- II. Estudar o mecanismo de ação *in vitro* e *in vivo* da curcumina livre e nanoencapsulada em diversas linhagens células tumorais;
- III. Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas após serem expostas ao campo magnético;
- IV. Realizar estudos teóricos do nanossistemas desenvolvido neste estudo com simulações de dinâmica molecular, com o intuito de entender o mecanismo de interação entre as NPMs e os polímeros, a cooperatividade entre as cadeias de polímeros e os seus efeitos sobre as propriedades magnéticas e magnetocalorífica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calero, M., Gutierrez, L., Salas, G., Luengo, Y., Lazaro, A., Acedo, P., Morales, M.P., Miranda, R., Villanueva, A., 2014. Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 10, 733-743.
2. Bohara, R.A., Thorat, N.D., Pawar, S.H., 2016. Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *Rsc Advances*, 6, 43989-44012.
3. Derfus, A.M., von Maltzahn, G., Harris, T.J., Duza, T., Vecchio, K.S., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N., 2007. Remotely triggered release from magnetic nanoparticles. *Advanced Materials*, 19, 3932.
4. Cintra e Silva, D.DeO., Eestevanato, L.L., Simoni, A.R., Rodrigues, M.M., Lacava, B.M., Lacava, Z.G., Tedesco, A.C., Morais, P.C., Bao, S.N., 2012. Successful Strategy for Targeting the Central Nervous System Using Magnetic Albumin Nanospheres. *J Biomed Nanotechnol*, 8, 1, 182-189.
5. Xu, L.G., Ma, W., Wang, L.B., Xu, C.L., Kuang, H., Kotov, N.A., 2013. Nanoparticle assemblies: dimensional transformation of nanomaterials and scalability. *Chemical Society Reviews*, 42, 3114-3126.
6. del Mercato, L.L., Rivera-Gil, P., Abbasi, A.Z., Ochs, M., Ganas, C., Zins, I., Sonnichsen, C., Parak, W.J., 2010. LbL multilayer capsules: recent progress and future outlook for their use in life sciences. *Nanoscale*, 2, 458-467.
7. Assa, F., Jafarizadeh-Malmiri, H., Ajamein, H., Vaghari, H., Anarjan, N., Ahmadi, O., Berenjian, A., 2017. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 492-509.
8. Boury, B., Plumejeau, S., 2015. Metal oxides and polysaccharides: an efficient hybrid association for materials chemistry. *Green Chemistry*, 17, 72-88.
9. Saether, H.V., Holme, H.K., Maurstald, G., Smidsrod, O., Stokke, B.T., 2008. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 74, 813-821.
10. Dias, A., Hussain, A., Marcos, A.S., Roque, A.C.A., 2011. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 142-155.
11. Antipina, M.N., Kiryukhin, M.V., Skirtach, A.G., Sukhorukov, G.B., 2014. Micropackaging via layer-by-layer assembly: microcapsules and microchamber arrays. *International Materials Reviews*, 59, 224-244.
12. Nelson, K.M., Dahlin, J.L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G.F., Walters, M.A., 2017. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 1620-1637.
13. Gera, M., Sharma, N., Ghosh, M., Huynh, D.L., Lee, S.J., Min, T., Kwon, T., Jeong, D.K., 2017. Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application. *Oncotarget*, 8, 66680-66698.
14. Kittitheeranun, P., Sajomsang, W., Phanpee, S., Treetong, A., Wutikhun, T., Suktham, K., Puttipipatkachorn, S., Ruktanonchai, U.R., 2015. Layer-by-layer engineered nanocapsules of curcumin with improved cell activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 492, 92-102.
15. Szczepanowicz, K., Jantas, D., Piotrowski, M., Staron, J., Leskiewicz, M., Regulaska, M., Lason, W., Warszynski, P., 2016. Encapsulation of curcumin in polyelectrolyte nanocapsules and their neuroprotective activity. *Nanotechnology*, 27, 14.
16. Mohanta, V., Madras, G., Patil, S., 2014. Layer-by-Layer Assembled Thin Films and Microcapsules of Nanocrystalline Cellulose for Hydrophobic Drug Delivery. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 6, 20093-20101.

17. Goethals, E.C., Shukla, R., Mistry, V., Bhargava, S.K., Bansal, V., 2013. Role of the Templating Approach in Influencing the Suitability of Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery: LbL vs SC/MS. *Langmuir*, 29, 12212-12219.
18. Manju, S., Sreenivasan, K., 2011a. Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 82, 588-593.
19. Shutava, T.G., Balkundi, S.S., Vangala, P., Steffan, J.J., Bigelow, R.L., Cardelli, J.A., O'Neal, D.P., Lvov, Y.M., 2009. Layer-by-Layer-Coated Gelatin Nanoparticles as a Vehicle for Delivery of Natural Polyphenols. *Acs Nano*, 3, 1877-1885.
20. Hu, K., Huang, X., Gao, Y., Huang, X., Xiao, H. Xiao., 2015. Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chemistry*, 182, 275-281.
21. Liu, Y., Liu, D., Zhu, L., Gan, Q., Le, X., et al., 2015. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food Research International*, 74, 97-105.
22. Sueth-Santiago, V., Mendes-Silva, G.P., Decote-Ricardo, D., De Lima, M.E.F., 2015 Curcumina. O pó dourado do açafão-da-terra: Introspecções sobre química e atividade biológicas. *Quim. Nova*, 38, 4, 538-552.
23. Nguyen, A.T., Winckler, P., Loison, P., Wache, Y., Chambin, O., et al., 2014. Physico-chemical state influences in vitro release profile of curcumin from pectin beads. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 290-298.
24. Masek, A., Crzescijanska, E., Zaborski, M., 2013. Characteristics of curcumin using cyclic voltammetry, UV-vis, fluorescence and thermogravimetric analysis, *Electrochim. Acta*, 107, 441-447.
25. Rao, P. J., Khanum, H. (2016). A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound e Curcumin. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 695-702.
26. Prasad, S., Gupta, S.C., Tyagi, A.K., Aggarwal, B.B., 2014. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnology Advances*, 32, 1053-1064.
27. Naksuriya, O., Okonogi, S., Skifellers, R.M., Hennink, W.E., 2014. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment, *Biomaterials*, 35, 3365-3383.
28. Jardim, K.V., Joanitti, G.A., Azevedo, R.B., Parize, A.L., 2015. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 56, 294-304
29. Pant, M.K., Panthari, P., Kharkwal, A., Kharkwal, H., Kharkwal, H., 2014. Curcumin: A wonder therapeutical drug. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 6, 374-396.
30. Anitha, A., Deepagan, V.G., Rani, V.V.D., Deepthy, M., Nair, S.V., Jayakumar, R., 2011. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate-chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 84, 1158-1164.
31. Neckel, G.L, Bubniak, L.S., Mazzarino, L., Jacques, A.V., Mocdelin, B., Siva, M.C.S., Senna, E.L., 2015. Orally Administered Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Containing Curcumin Attenuate Metastatic Melanoma in the Lungs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 3524-3534.
32. Codevilla, C.F., Barin, J.S., Da Silva, C. de B., Da Silva, T.M., De Menezes, C.R., 2015. Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review. *Ciência e Natura*, 37, 153-163.
33. Mancarella, S., Greco, V., Baldassarre, F., Vergara, D., Maffia, M., Leporatti, S., 2015. Polymer-Coated Magnetic Nanoparticles for Curcumin Delivery to Cancer Cells. *Macromolecular Bioscience*, 15, 1365-1374.

34. Manju, S., Sreenivasan, K., 2011b. Enhanced Drug Loading on Magnetic Nanoparticles by Layer-by-Layer Assembly Using Drug Conjugates: Blood Compatibility Evaluation and Targeted Drug Delivery in Cancer Cells. *Langmuir*, 27, 14489-14496.
35. Manatunga, D.C., de Silva, R.M., de Silva, K.M.N., de Silva, N., Bhandari, S., Yap, Y.K., Costha, N.P., 2017. pH responsive controlled release of anti-cancer hydrophobic drugs from sodium alginate and hydroxyapatite bi-coated iron oxide nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117, 29-38.
36. Sari, T.P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R.R.B., Sharma, R., Bhardwaj, M., Athira, S., 2015. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, 540-546.
37. Li, Z., Jiang, H., Xu, C, Gu, L.. 2015. A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 43, 153-164.
38. Veisoh, O., Grunn, J.W., Zhang, M., 2010. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 284–304.
39. Falleiros, J.P.B., Brandi, A.L., Da Fonseca, A.R.A., 2011. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, 8, 1.
40. Niemirowicz, K.H., Wilczewska, A.Z., Car, H., 2012. Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. *Advances in Medical Sciences*, 57, 2, 196–207.
41. Cancino, J., Marangoni, V.S., Zucolotto, V., 2014. Nanotecnologia em medicina: Aspectos fundamentais e principais preocupações. *Quim. Nova*, 37, 3, 521-526.
42. Liu, L., Chen, B., Teng, F., 2010. Effect of Fe₃O₄-magnetic nanoparticles on acute exercise enhanced KCNQ1 expression in mouse cardiac muscle. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 109–116.
43. Harris, G.V., Geiler, A., Chen, Y., Yoon, S.D., Wu, M., Yang, A., Chen, Z., He, P., Parimi, P.V., Zuo, X., Patton, C.E., Abe, M., Acher, O., Vittoria, C., 2009. Recent advances in processing and applications of microwave ferrites, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 2035-2047.
44. Carneiro, M.L., Peixoto, R.C., Joanitti, G.A., Oliveira, R.G., Telles, L.A., Miranda-Veleta, A.L., Bocca, A.L., Vianna, L.M., Da Silva, I.C., De Souza, A.R., Lacava, Z.G., Bao, S.N., 2013. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *Journal Nanobiotechnology*, 11, 4.
45. Varshney, D., Verma, K., Kumar, A., 2011. Substitutional effect on structural and magnetic properties of AxCo_{1-x}Fe₂O₄ (A=Zn, Mg and x=0.0, 0.5) ferrites, *Journal of Molecular Structure*, 1006, 447-452.
46. Carriao, M.S., Aquino, V.R.R., Landi, G.T., Verde, E.L., Sousa, M.H., Bakuzis, A.F., 2017. Giant-spin nonlinear response theory of magnetic nanoparticle hyperthermia: A field dependence study. *Journal of Applied Physics*, 121, 13.
47. Kulkarni, S.A., Sewadh, P.S., Palei, P.K., Kokate, K.K., 2014. Effect of synthesis route on the structural, optical and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles, *Ceram. Int*, 40, 1, 1945–1949.
48. Asuha, S., Suyala, B., Siqintana, X., Zhao, S., 2011. Direct Synthesis of Fe₃O₄ Nanopowder by Thermal Decomposition of Fe-Urea Complex and Its Properties. *J. Alloys Compd*, 509, 6, 2870-2873.
49. Lu, T., Wang, J., Yin, J., Wang, A., Wang, X., Zhang, T., 2013. Surfactant effects on the microstructures of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by microemulsion method. *Colloids Surf*, 436, 675-683.
50. Nunes, A.D.C., Ramalho, L.S., Souza, A.P.S., Mendes, E.P., Colugnati, D.B., Zufelato, N., Sousa, M.H., Bakuzis, A.F., Castro, C.H., 2014. Manganese

- ferrite-based nanoparticles induce ex vivo, but not in vivo, cardiovascular effects. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3299-3312.
51. Jha, D.K., Shameen, M., Patel, A.B., Kostka, A., Schneider, P., Erbe, A., Dob, P., 2013. Simple synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles as highly efficient contrast agent. *Mater. Lett*, 95, 186-189.
 52. Sharma, U.S., Sharma, R.N., Shah, R., 2014 Physical and Magnetic Properties of Manganese Ferrite Nanoparticles. *Journal of Engineering Research and Applications*, 4, 14-17.
 53. Roohi, F., Lohrke, J., Ide, A., Schutz, G., Dassler, K., 2012. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, 7, 4447-4458.
 54. Marangoni, V.S., Martins, M.V.A., Souza, J.A., Oliveira Jr, O.N., Zucolotto, V., Crespihlo, F.N., 2012. The processing of polyelectrolyte covered magnetite nanoparticles in the form of nanostructured thin films. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 4, 769-778.
 55. Hunter, R.J., 2009. *Foundations of colloid science*. 2^oed. New York. Oxford University Press.
 56. Sargentelli, V., Ferreira, A.P., 2010. Magnetic nanoparticles: the cobalto. *Eclética Química*, 35, 4.
 57. Galvein, P., Thompson, D., Ryan, K.B., McCarthy, A., Moore, A.C., Burke, C.S., Dyson, M., Maccraith, B.D., Gun'ko, Y.K., Byrne, M.T., Volkov, Y., Keely, C., Keehan, E., Howe, M., Duffy, C., MacLoughlin, R., 2012. Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 69. 3, 389-404.
 58. Ivanova, V., Petrova, P., Hristov, J., 2011. Application in the Ethanol Fermentation of Immobilized Yeast Cells in Matrix of Alginate/Magnetic nanoparticles, on Chitosan-Magnetite Microparticles and Cellulose-coated Magnetic nanoparticles. *Int. Rev. Chem. Eng*, 3, 289-299.
 59. Lucinda-Silva, R.M., Salgado, H.R.N, Evangelista, R.C., 2010. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*, 81, 260-268.
 60. Mendoza-Dorantes, T., Pala, U., Vega-Acosta, J.R., Márquez-Beltrán, C., 2013. Encapsulation and surface charge manipulation of organic and inorganic colloidal substrates by multilayered polyelectrolyte films. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 434, 253-259.
 61. Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M.F., Gutiérrez, L., Morales, M.P., Bohm, I.B., Heverhagen, J.T., Prospero, D., Parak, W.J., 2012. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev*, 41, 4306-4334
 62. Liu, J., Zhang, Y., Wang, C., Xu, R., Chen, Z., Gu, N., 2010. Magnetically Sensitive Alginate-Templated Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules for Controlled Release of Doxorubicin. *J. Phys. Chem. C*, 114, 7673-7679.
 63. You, J-O., Almeda, D., Ye, G.J.C., Auguste, D.T., 2010. Bioresponsive matrices in drug delivery. *Journal of Biological Engineering*, 4, 15.
 64. Seth, A., Lafargue, D., Poirier, C., Péan, J-M., Ménaguer, C., 2014 Performance of magnetic chitosan–alginate core–shell beads for increasing the bioavailability of a low permeable drug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1-8.
 65. Finotelli, P.V., Da Silva, D., Sola-Penna, M., Rossi, A.M., Farina, M., Andrade, L.R., Takeuchi, A.Y., Rocha-Leão, M.H., 2010. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 206-211.
 66. Lu, C., Liu, P., 2012, Effect of chitosan multilayers encapsulation on controlled release performance of drug-loaded superparamagnetic alginate nanoparticles. *J Mater Sci: Mater Med*, 23, 393-398.

67. Liu, X., Chen, X., Li, Y., Wang, X., Peng, X., Zhu, W., 2012. Preparation of Superparamagnetic Fe₃O₄@Alginate/Chitosan Nanospheres for *Candida rugosa* lipase Immobilization and Utilization of Layer-by-Layer Assembly to Enhance the Stability of Immobilized Lipase. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4, 5169-5178.
68. Agarwal, S., Leekha, A., Tyagi, A., Kumar, V., Moin, I., Verma, A.K., 2015, Versatility of Chitosan: A Short Review. *Journal of Pharma Research*, 4, 3, 125-134.
69. Biswas, S., Chattopadhyay, M., Sen, K.K., Saha, M.K., 2015. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice, *Carbohydr. Polym.*, 121, 403-410.
70. Neves, M.A., Hashemi, J., Prentice, C., 2015. Development of novel bioactives delivery systems by micro/nanotechnology, *Curr. Opin. Food Sci*, 1, 7-12.
71. Senyigit, T., Sonvico, F., Barbieri, S., Özer, Ö., Santi, P., Colombo, P., 2010. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17- propionate capable of accumulation in pig skin. *Journal of Controlled Release*, 142, 368-373.
72. Hafner, A., Durrigl, M., Pepic, I., Filipovici, J., 2011. Short- and Long-Term Stability of Lyophilised Melatonin Loaded Lecitin/Chitosan nanoparticles. *Chem. Pharm. Bull*, 59, 9, 1117-1123.
73. Qi, T., Weidong, L., Chenyu, G., Guangxi, Z., 2011. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1621-1630.
74. Barros, L.B., Jimeno, S.G., Estelrich, J., 2014. Formation and characterization of biobased magnetic nanoparticles double coated with dextran and chitosan by layer-by-layer deposition. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 450, 121-129.
75. Patil, R.M., Shete, P.B., Thorat, N.D., Otari, S.V., Barick, K.C., Prasad, A., Ningthoujam, R.S., Tiwale, B.M., Pawar, S.H., 2014. Superparamagnetic iron oxide/chitosan core/shells for hyperthermia application: Improved colloidal stability and biocompatibility. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 355, 22-30.
76. Anirudhan, T.S., Gopal, S.S., Sandeep, S., 2014. Synthesis and characterization of montmorillonite/N-(carboxyacyl) chitosan coated magnetic particle nanocomposites for controlled delivery of paracetamol. *Applied Clay Science*, 88, 89, 151-158.
77. Yang, J., Xie, J., He, W., 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, 84, 33-39.
78. Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.
79. Martins, G.V., Mano, J.F., Alves, N.M., 2010. Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. *Carbohydrate Polymers*, 80, 570-573.
80. Hamman, J.H., 2010. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, 8, 1305-1322.
81. Chen, A., Chen, M., Wang, M., Huang, X., Liu, Y., Chen, Z., 2011. Poly(L-histidine)-Chitosan/Alginate Complex Microcapsule as a Novel Drug Delivery Agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 1, 3728-3733.
82. Cheng, Y.Y., Chen, S.B., 2011. Complexation of cationic polyelectrolyte with anionic phospholipid vesicles: Concentration, molecular weight and salt effects. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354, 226-233.
83. Yogeshkumar, G., Vikram, S., Abhimanyu, B., Adhikrao, Y., 2010. Stability enhancement of aloegel by formulating polyelectrolyte complex Beads. *Int. J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 66-69.

84. Akbarzadeh, A., Saniel, M., Davaran, S., 2012. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7, 144.
85. Schladt, T.D., Sshneider, K., Scild, H., Tremel, W., 2011. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton Trans*, 40, 6315.
86. Kennedy, L.C., Bickford, L.R., Lewinski, N.A., Coughlin, A.J., Hu, Y., Day, E.S., West, J.L., Drezek, R.A., 2010. A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small*, 1-15.
87. Joye, I.J., McClements, D.J., 2014. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: fabrication, characterization, and application. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 19, 5, 417-427.
88. Steichen, S.D., Caldorera-Moore, M., Peppas, N.A.A., 2013. review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *J. Pharm. Sci.*, 48, 3, 416-427.
89. Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P., 2013. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.*, 12, 11, 991-1003.
90. Fleige, E., Quadir, M.A., Haag, R., 2012. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 9, 866-884.
91. Varelas, C.G., Dixon, D.G., Carol, S., 1995. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. *J. Controlled Release*, Amsterdam, 34, 3, 185-192.
92. Ritger, P., Peppas, N.A., 1987. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release*, Amsterdam, 5, 1, 37-42.
93. Higuchi, T., 1961. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.*, New York, 50, 874-875.
94. Siepmann, J., Peppas, N.A., 2011. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *Int. J. Pharm.*, 418, 6-12.
95. Rocha-García D., Guerra-Contreras A., Rosales-Mendoza S., Palestino G., 2016. Role of porous silicon/hydrogel composites on drug delivery. *Mesoporous Biomater*, 3, 93-101.
96. Gallagher, K.M., Corrigan, O.I., 2000. Mechanistic aspects of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers. *J Control Release*, 69, 261-72.
97. Herea, D., Chiriac, H., Lupu, N., 2011. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles with controlled magnetization. *J Nanopart Res*, 13, 4357-4369.
98. Prijic, S., Sersa, G., 2011. Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. *Radiol Oncol*, 45, 1, 1-16.
99. Bañobre-López, M., Teijeiro, A., Rivas, J., 2013. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 18, 397-400.
100. Silva, A.C., Oliveira, T.R., Mamani, J.B., Malheiros, S.M.F., Malavolta, L., Pavon, L.F., Sibov, T.T., Amaro Jr, E., Tannus, A., Vidoto, E.L.G., Martins, M.J., Santos, R.S., Gamarra, L.F., 2011. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment *International Journal of Nanomedicine*, 6, 591-603.
101. Yang, J., Park, S.B., Yoon, H.G., Huh, Y.M., Haam, S., 2006. Preparation of poly ε-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 324, 185-190.
102. Tran, L.D., Hoang, N.M.T., Mai, T.T., Tran, H.V., Nguyen, N.T., Tran, T.D., Do, M.H., Ngueyen, Q.T., Pham, D.G., Ha, T.P., Le, H.V., Nguyen, P.X., 2010. Nanosized magnetofluorescent Fe₃O₄ – curcumin conjugate for

- multimodal monitoring and drug targeting. *Colloids and Surfaces A*, 371, 104-112.
103. Laurent, S., Dutz, S., Hafeli, U.O., Mahmoudi, M., 2011. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.*, 166, 1-2, 8-23.
 104. Chatterjee, D.K., Diagaradjane, P., Krishnan, S., 2011. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther Deliv*, 2, 8, 1001-1014.
 105. Salunkhe, A.B., Khot, V.M., Pawar, S.H., 2014. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: A status review, *Curr Top Med Chem*, 14, 572-94.
 106. Deatsch, A.E., Evans, B.A., 2014. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.*, 1 de 2163-172, 354.
 107. Connolly, Q.A.P.J., Jones, S.K., Dobson, J., 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Appl. Phys D.*, 36, 167-181.
 108. Amiri, S., Shokrollahi, H., 2013. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Mater Sci Eng C*, 33, 1-8.
 109. Desh, A.K., Cudworth, I.G.C., 1998. Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40, 1-12.
 110. Liu, T., Hu, S., Liu, D., Chen, S., Chen, I., 2009. Biomedical nanoparticle carriers with combine thermal and magnetic responses. *Nano Today*, 4, 52-65.
 111. Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones S.K., Dobson, J., 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D.*, 36, 167-181.
 112. Bajpai, A.K., Gupta, R., 2011. Magnetically mediated release of ciprofloxacin from polyvinyl alcohol based superparamagnetic nanocomposites. *J Mater Sci Mater Med*, 22, 357-369.
 113. Anwar, M., Asfer, M., Prajapati, A.P., Mohapatra, S., Akhter, S., Ali, A., Ahmada, F.J., 2014. Synthesis and in vitro localization study of curcumin-loaded SPIONs in a micro capillary for simulating a targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 468, 158-164.
 114. Chalkidou, A., Simeonidis, K., Angelakeris, M., Samaras, T., Martinez-Boubeta, C., Balcells, L.I., Papazisis, K., Dendrinou-Samara, C., Kalogirou, O., 2011. *In vitro* application of Fe/MgO nanoparticles as magnetically mediated hyperthermia agents for cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323, 775-780
 115. Zamora-Mora, V., Fernández-Gutiérrez, M., Romána, J.S., Goya, G., Hernández, R., Mijango, C., 2014. Magnetic core-shell chitosan nanoparticles: Rheological characterization and hyperthermia application. *Carbohydrate Polymers*, 102, 691-698.
 116. Wang, F.Q., Li, P., Zhang, J.P., Wang, A.Q., Wei, Q., 2010. A novel pH-sensitive magnetic alginate-chitosan beads for albendazole delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 36, 867-877.
 117. Liu, H.J., Li, P., Wei, Q., 2010. Magnetic *N*-succinyl chitosan/alginate beads for carbamazepine delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 36, 1286-1294.
 118. Kim, D-H., Nikles, D.E., Brazel, C.S., 2010. Synthesis and characterization of multifunctional chitosan-MnFe₂O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia and drug delivery. *Materials*, 3, 4051-4063.
 119. Campos, A.F.C., Tourinho, F.A., Da Silva, G.J., Lara, M.C.F.L. L., Depeyrot, J., 2001. Nanoparticles Superficial Density of Charge In Electric Double-Layered Magnetic Fluid: a Conductimetric and Potentiometric Approach. *European Physical Journal*, 6, 29-35.
 120. Farris, S., Mora, L., Capretti, G., Piergiovanni, L., 2012. Charge Density Quantification of Polyelectrolyte Polysaccharides by Conductometric Titration: An Analytical Chemistry Experiment. *Journal of Chemical Education*, 89, 121-124.

121. Sauerbrey, G.Z., 1959. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys*, 155, 206-222.
122. Alvarenga, E.S., 2011. Characterization and Properties of chitosan. *Biotechnology of Biopolymers*, 5, 91-108.
123. Coelho, B.C.P., Siqueira, E.R., Ombredane, A.S., Joanitti, G.A., Chaves, S.B., Da Silva, S.W., Chaker, J.A., Longo, J.P.F., Azevedo, R.B., Morais, P.C., Sousa, M.H., 2017. Maghemite–gold core–shell nanostructures (γ -Fe₂O₃@Au) surface-functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy. *RSC Adv.*, 7, 11223-11232.
124. ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology, 2005.
125. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE n° 899, de 23 de maio de 2003.
126. Sun, C., Xie, Y., Tian, Q., Liu, H., 2007. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. *Colloids Surf., A*, 305, 42-47.
127. Gonsalves, A.A., et al., 2011. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, 34, 7, 1215-1223.
128. Cabuil, V., Dupuis, V., Talbot, D., Neveu, S., 2011. Ionic magnetic fluid based on cobalt ferrite nanoparticles: Influence of hydrothermal treatment on the nanoparticle size. *J Magnetism Magnetic Materials*, 323, 10, 1238-1241.
129. Li, X-H., Xu, C-L., Han, X-H., Qiao, L., Wang, T., Li, F-S., 2010. Synthesis and magnetic properties of nearly monodisperse CoFe₂O₄ nanoparticles through a simple hydrothermal condition. *Nano Express*, 5, 1039-1044.
130. Vendrame, S.C., Cótica, L.F., Freitas, V.F., Dias, G.S., Santos, I.A., Khalil, M.M., et al., 2012. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. *J Magn Magn Mater*, 324, 559-563.
131. Vermekar, A.A., Dias, T., Ghosh, S., Muges, G., 2016. A Remarkably Efficient MnFe₂O₄-based Oxidase Nanozyme. *Chem. Asian J.*, 11, 1, 72-76.
132. Varela, H., Malta, M., Torresi, R.M., 2000. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: A microbalança a cristal de quartzo. *Química Nova*, 23, 5, 664-679.
133. Kasper, M., Traxler, L., Salopek, J., Grabmayr, H., Ebner, A., Kienberger, F., 2016. Broadband 120 MHz Impedance Quartz Crystal Microbalance (QCM) with Calibrated Resistance and Quantitative Dissipation for Biosensing Measurements at Higher Harmonic Frequencies. *Biosensors*, 6, 23, 1-13.
134. Gregurec, D., Olszyna, M., Politakos, N., Yate, L., Dahne, L., Moya, S.E., 2015. Stability of polyelectrolyte multilayers in oxidizing media: a critical issue for the development of multilayer based membranes for nanofiltration. *Colloid Polym Sci.*, 293, 381-388.
135. Cho, E. J., Holback, H., Liu, K.C., Abouelmagd, S.A., Park, J., Yeo, Y., 2013. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 2093-2110.
136. Tsai, Y-M. et al., 2011. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *International Journal of Pharmaceutics*.
137. Silva, M.C., Fideles, T.B., Fook, M.V.L., 2015. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação. ionotrópica: influência da incorporação do fármaco *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 10, 1, 21-28.

138. Mendoza-Dorantes, T., Pal, U., Vega-Acosta, J.R., Marquez-Beltran, C., 2013. Encapsulation and surface charge manipulation of organic and inorganic colloidal substrates by multilayered polyelectrolyte films. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 434, 253-259.
139. Zhang, L., Qiu, J., Wu, X., Zhang, W., Sakai, E., We, Y., 2014. Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization. *Eng. Chem. Res*, 53, 3448-3454.
140. Liao, S.H., Liu, C.H., Bastakoti, B.P., Suzuki, N., Chang, Y., Yamauchi, Y., Lin, F.H., Wu, K.C.W., 2015. Functionalized magnetic iron oxide/alginate core-shell nanoparticles for targeting hyperthermia. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3315-3328.
141. Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R., 2004. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 35-52.
142. Felix, L.L., Coaquira, J.A.H., Martinez, M.A.R., Goya, G.F., Mantilla, J., Sousa, M.H., Valladares, L.D., Barnes, C.H.W., Morais, P.C., 2017. Structural and magnetic properties of core-shell Au/Fe₃O₄ nanoparticles. *Scientific Reports*, 7, 8.
143. Saini, R.K., Srivastava, A.K., Gupta, P.K., Das, K., 2011. pH dependent reversible aggregation of Chitosan and glycol-Chitosan stabilized silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters*, 511, 326-330.
144. Sing, K.S., Everett, D.H., Haul, R.A.W., Moscou, L., Pierotti, R.A., Rouqueirol, J., Siemieniewska, T., 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems: with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 4, 603-619.
145. Lowell, S., Shields, J.E., 1991. *Powder Surface Area and Porosity*. 3.ed. London: Chapman & Hall, 256.
146. Lu, W., Le, X., Zhang, J., Huang, Y., Chen, T., 2017. Supramolecular shape memory hydrogels: a new bridge between stimuli-responsive polymers and supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 46, 1284-1294.
147. Yang, Y-J., Tao, X., Hou, Q, Ma, Y., Chen, X-L., Chen, J-F., 2010. Mesoporous silica nanotubes coated with multilayered polyelectrolytes for pH-controlled drug release. *Acta Biomaterialia*, 6, 3092-3100.
148. Sahoo, B., Devi, K.S.P., Dutta, S., Maiti, T.K., Pramanik, P., Dhara, D., 2014. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 431, 31-41.
149. Shrestha, S., Jiang, P.F., Sousa, M.H., Morais, P.C., Mao, Z.W., Gao, C.Y., 2016. Citrate-capped iron oxide nanoparticles impair the osteogenic differentiation potential of rat mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 4, 245-256.
150. Bagre, A.P., Jain, K., Jain, N.K., 2013. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 456, 31-40.
151. Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Saladini, B., Gallucci, M. C., Cruciani, F., Vitali, B., Luppi, B., 2013. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. *Carbohydrate Polymers*, 91, 651-658.
152. Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., Grondahl, L., 2007. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8, 2533-2541.
153. Arulmoorthy, M.P., Srinivasan, M., 2015. Preparation, characterization and antimicrobial activity of curcumin loaded chitosan and alginate

- biocomposite edible films impregnated with silver nanoparticle. *Sch. Acad. J. Biosci*, 3, 9, 712-719.
154. Li, L., Xiang, D.X., Shigdar, S., Yang, W.R., Li, Q., Lin, J., Liu, K.X., Duan, W., 2014. Epithelial cell adhesion molecule aptamer functionalized PLGA-lecithin-curcumin-PEG nanoparticles for targeted drug delivery to human colorectal adenocarcinoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1083-1096.
 155. Dong, C., Chena, W., Liua, C., Liu, Y., Liubakey, H., 2014. Synthesis of magnetic chitosan nanoparticle and its adsorption property for humic acid from aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 446, 179-189.
 156. Rodrigues, S., Da Costa, A.R., Grenha, A., 2012. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydr. Polym.*, 89, 282-289.
 157. Khalkhali, M., Rostamizadeh, K., Sadighian, S., Khoeini, F., Naghibi, M., Hamidi, M., 2015. The impact of polymer coatings on magnetite nanoparticles performance as MRI contrast agents: a comparative study. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 1, 45.
 158. Menegucci, J.D., Santos, M., Dias, D.J.S., Chaker, J.A., Sousa, M.H., 2015. One-step synthesis of magnetic chitosan for controlled release of 5-hydroxytryptophan. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 117-124.
 159. Lakouraj, M.M., Mojerlou, F., Zare, E.N., 2014. Nanogel and superparamagnetic nanocomposite based on sodium alginate for sorption of heavy metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 106, 34-41.
 160. Vestal, C.R., Zhang, Z.J., 2003. Effects of surface coordination chemistry on the magnetic properties of $MnFe_2O_4$ spinel ferrite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 125, 9828-9833.
 161. Gomes, J.A., Sousa, M.H., da Silva, G.J., Tourinho, F.A., Mestnik, J., Itri, R., Azevedo, G.D., Depeyrot, J., 2006. Cation distribution in copper ferrite nanoparticles of ferrofluids: A synchrotron XRD and EXAFS investigation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 300, E213-E216.
 162. Sousa, E.C., Alves, C.R., Aquino, R., Sousa, M.H., Goya, G.F., Rechenberg, H.R., Tourinho, F.A., Depeyrot, J., 2005. Experimental evidence of surface effects in the magnetic dynamics behavior of ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289, 118-121.
 163. Gazeau, F., Dubois, E., Bacri, J.C., Boue, F., Cebers, A., Perzynski, R., 2002. Anisotropy of the structure factor of magnetic fluids under a field probed by small-angle neutron scattering. *Physical Review*, E 65, 15.
 164. Branquinho, L.C., Carriao, M.S., Costa, A.S., Zufelato, N., Sousa, M.H., Miotto, R., Ivkov, R., Bakuzis, A.F., 2013. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. *Scientific Reports*, 3, 10.
 165. Rodovalho, F.L., Capistrano, G., Gomes, J.A., Sodre, F.F., Chaker, J.A., Campos, A.F.C., Bakuzis, A.F., Sousa, M.H., 2016. Elaboration of magnetothermally recyclable nanosorbents for remote removal of toluene in contaminated water using magnetic hyperthermia. *Chemical Engineering Journal*, 302, 725-732.
 166. Ghalandarlaki, N., Alizadeh, A., Ashkani- Esfahani, S. (2014). Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. *BioMed Research International*, 2014, 1-23.
 167. Bhatia, N.K., Kishor, S., Katyal, N., Gogoi, P., Naranga, P., Deep, S., 2016. Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol. *RSC Adv.*, 6, 103275-103288

168. Jagannathan, R., Abraham, P.M., Poddar, P, 2012. Temperature-Dependent Spectroscopic Evidences of Curcumin in Aqueous Medium: A Mechanistic Study of Its Solubility and Stability. *J. Phys. Chem. B*, 116, 50, 14533-14540
169. Mazzarino, L., Loch-Neckel, G., Bubniak, L. dos S., Mazzucco, S., Santos-Silva, M.C., Borsali, R., Lemos-Senna, E., 2015. Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 1, 781-791.
170. Das, R.K., Kasoju, N., Bora, U., 2010. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 6, 153-160.
171. Tavakol M, Vasheghani-Farahani E, Dolatabadi-Farahani T, Hashemi-Najafabadi S., 2009. Sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. *Carbohydr Polym.*, 77, 326-330.
172. Lin YH, Liang HF, Chung CK, Chen MC, Sung HW., 2005. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 26, 2105-2113.
173. Pal, K., Singh, V.K., Anis, A., Thakur, G., Bhattacharya, M.K., 2014. Hydrogel-Based Controlled Release Formulations: Designing Considerations, Characterization Techniques and Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 37-41.
174. Jia, H., Kerr, L. L., 2015. Kinetics of Drug Release from Drug Carrier of Polymer/TiO₂ Nanotubes Composite-pH Dependent Study. *Journal of Applied Polymer Science.* 1-11.
175. Carrião, M.S., Bakuzis, A.F., 2016. Mean-field and linear regime approach to magnetic hyperthermia of coreshell nanoparticles: Can tiny nanostructures fight cancer? *Nanoscale*, 1-16.
176. Ahn, S., Seo, E., Kin, K., Lee, S.J., 2013. Controlled cellular uptake and drug efficacy of nanotherapeutics. *Scientific Reports.* 3, 1-10.
177. Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Tortia, F.M., Tortic, S.V., 2008. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1631-1652.
178. Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., Suresh, S., 2009. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater.* 21, 419-424.
179. Hiroshi, M., Hideaki, N., Jun, F., 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 71-79.
180. Hanahan D, Weinberg R., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 144, 646-674.
181. Bayoni, S.M., El-Kashef, H.A., Eli-Ashmawy, M.B., Nasr, M.N., El-Sherbeny, M.A., Badria, F.A., Abou-Zeid, L.A., Ghaly, M.A., Abdel-Aziz, N.I., 2013. Synthesis and biological evaluation of new curcumin derivatives as antioxidant and antitumor agents. *Med Chem Res.*, 22, 1147-1162.
182. Bozta, A.O., Karakuzu, O., Galante, G., Ugur, Z., Kocabas, F., Altuntas, C.G., Yazayadin, A.O., 2013. Synergistic Interaction of Paclitaxel and Curcumin with Cyclodextrin Polymer Complexation in Human Cancer Cells. *Molecular pharmaceuticals*, 10, 2676-2683.
183. Zhi-Dong, L., Xiang-Ping, L., Wei-Jun, Z., Qian, D., Fu-Nian, L., Hai-Bo, W., Bin, K., 2014. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 6, 2818-2824.
184. Cai, Y., C. Cao, et al., 2015. Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *International journal of nanomedicine*, 10, 2619.