



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Síntese de polilactídeo com fluorescência no infravermelho próximo para futuras aplicações nanoteranósticas

Maria Alice de Oliveira

Ouro Preto

2019

Maria Alice de Oliveira

Síntese de polilactídeo com fluorescência no infravermelho próximo para futuras aplicações nanoteranósticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Co-orientadora: Dr.^a Gwenaelle Elza Nathalie Pound-Lana

Ouro Preto

2019

O481s Oliveira, Maria Alice de.
Síntese de polilactídeo com fluorescência no infravermelho próximo para futuras aplicações nanoteranósticas [manuscrito] / Maria Alice de Oliveira. - 2019.
79f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gwenaelle Pound-Lana.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Polilactídeo. 2. Cicloadição . 3. Nanopartículas. I. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. II. Pound-Lana, Gwenaelle . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 620.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 150ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Maria Alice de Oliveira**, com a defesa da dissertação intitulada: “Síntese de polilactídeo com fluorescência no infravermelho próximo para futuras aplicações nanoteranósticas”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 18 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. André Luis Branco de Barros
UFMG

Prof. Dr. Cláudio Gouvea dos Santos
UFOP

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
UFOP

LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia (LDGNano) - Escola de Farmácia/ UFOP.

LABORATÓRIOS DE APOIO

Laboratório Multiusuário/ CiPharma/ Escola de Farmácia/ UFOP.

Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas (LMCM)/ CiPharma/ Escola de Farmácia/ UFOP.

Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ)/ CiPharma/ Escola de Farmácia/ UFOP.

Laboratório de Física/ Universidade de Stellenbosch – África do Sul

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Dedico este trabalho...

... à minha família, em especial minha mãe, minha maior incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas e por sempre iluminar meus caminhos, ainda que não os conheça.

Aos meus pais e meu irmão Matheus, por todo o incentivo, por sempre acreditarem em mim, apoiarem minhas escolhas e compreenderem a minha ausência. Sem o amor de vocês não seria possível chegar aqui.

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG, à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), a Escola de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma), pelo auxílio financeiro, pela estrutura cedida e pela oportunidade de realizar este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

As minhas orientadoras prof.^a dr.^a Vanessa Carla Furtado Mosqueira e dr.^a Gwenaelle Pound-Lana, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim ao me aceitar como aluna e por todo o conhecimento que adquiri trabalhando com vocês.

Aos amigos do LDGNano: Marina, Elisa, Aline, Larissa, Izabel, Douglas, Giani, Mateus pelos bons e não tão bons momentos compartilhados, pelo apoio quando os experimentos não saiam como planejado, por toda colaboração e aprendizado compartilhado. Em especial quero agradecer a Marina, por colaborar tanto para a realização desse trabalho, por sempre estar disponível para me ajudar.

As alunas de IC Thaís, Márcia, e em especial a Sabrina, por me auxiliarem na realização desse trabalho.

A todos os funcionários do CiPharma e da Escola de Farmácia, pela boa convivência e pelo ambiente agradável. A Mirela, por toda atenção que recebi sempre que precisei. A todos os professores, por todo o conhecimento compartilhado.

Aos técnicos Patrícia, Renata, Amanda e Hygor por estarem sempre disponíveis para me auxiliar.

A tia Ângela e ao João Paulo, por todo o carinho e incentivo.

Ao Brayan, por sempre apoiar minhas escolhas e me incentivar a seguir a diante, por todo companheirismo e amor.

As queridas amigas Ana Paula, Luciene, Thais F., Mariana, Jéssica e Thaís O. que, as vezes mesmo de longe, sempre estiveram ao meu lado, por nunca me

deixarem desistir, por me apoiar, por me ouvir e tornar meus dias sempre melhores.
As amigas Jéssica D. e Carina, por me incentivar e me apoiar a fazer o mestrado.

Aos alunos do CiPharma, por compartilharem a caminhada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos vocês minha sincera gratidão!

RESUMO

Os marcadores fluorescentes que absorvem na região espectral do infravermelho próximo (NIR) podem ser empregados como fotossensibilizadores nas terapias fotodinâmica e fototérmica para tratamento de câncer. Além disso, essas sondas são úteis na detecção de nanocarreadores, pois permitem o rastreamento do destino dessas partículas *in vivo* por meio de técnicas de imagem pouco invasivas. No entanto, são necessárias estratégias para garantir a estabilidade de ligação e a concentração adequada do marcador nas nanopartículas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a conjugação de um derivado carbocianina, o marcador IR780, com polilactídeos (PLA) para obtenção de um polímero que possa ser empregado em estudos pré-clínicos para avaliação da biodistribuição de nanopartículas. PLA reativos foram sintetizados via polimerização por abertura de anel (ROP) do D,L-lactídeo com um iniciador contendo um grupo ciclooctila, via catalise por octanoato de estanho ou triazabicyclodeceno (TBD). Análise da reatividade dos PLA demonstrou que apenas os polímeros obtidos por reação catalisada pelo TBD eram reativos frente a azidas orgânicas. O IR780 foi derivatizado e conjugado à PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC). O sucesso da reação foi confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nanopartículas contendo o IR780 conjugado ao PLA (IR-PLA) associado a diferentes poliésteres (PCL, PLGA e PEG-PLA) foram preparadas por nanoprecipitação e caracterizadas pela técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) associada a detecção por espalhamento de luz e fluorescência (AF4-MALS-FLD). Análises por AF4-MALS-FLD demonstraram que as nanopartículas apresentam fluorescência estável, que não foi transferida para proteínas séricas quando incubadas a 37°C em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, além disso observou-se que o IR-PLA foi capaz de se associar a diferentes poliésteres, formando NP estáveis. Sendo assim, o IR-PLA mostrou ser um marcador fluorescente polimérico versátil, que pode ser associado a diferentes poliésteres biodegradáveis para a marcação dos nanocarreadores mais seguros e mais utilizados na área farmacêutica.

Palavras-chave: IR780, polilactídeo, cicloadição azida-alcino, nanopartículas fluorescentes, fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4)

ABSTRACT

Fluorescent near-infrared (NIR) dyes are useful to monitor nanocarriers *in vivo* and can serve as photosensitizers in cancer therapy. Furthermore, these probes are useful in *in vivo* detecting nanocarriers, because they allow tracking of these particles. However, new strategies need to be developed in order to guarantee that the dye photo-physical properties and dye loading within the nanocarrier remain stable. The aim of this work were the chemical conjugation of a carbocyanine, IR780 dye, to polylactide (PLA) for stable fluorescent labeling of biodegradable polymeric nanocarriers. Reactive PLA were synthesized via ring-opening polymerization of D,L-lactide with an initiator containing a cyclooctyne group, via catalysis by tin octanoate or triazabicyclodecene (TBD). Analysis of PLAs reactivity showed that only the polymer obtained by reaction catalyzed by TBD were reactive against organic azides. IR780 was derivatized and conjugated to PLAs via a one-pot strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) reaction. The success of the reaction was confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC). Nanoparticles (NP) containing the dye – polymer conjugate (IR-PLA) associated with different polyesters (PCL, PLGA and PEG-PLA) were prepared by nanoprecipitation and characterized by asymmetric flow field-flow fractionation with light scattering and fluorescence detection (AF4-MALS-FLD). The analyses of AF4-MALS-FLD data revealed that NIR fluorescence of the NP remained stable and was not transferred to serum proteins at 37°C, furthermore it was observed that IR-PLA was capable of associating with different polyesters, forming stable NP. Thus, IR-PLA has been shown to be a versatile fluorescent polymeric-dye, which can be associated with different biodegradable polyesters for marking the safest and most used nanocarriers in the pharmaceutical field.

Key-words: IR780, polylactide, azide-alkyne cycloaddition, fluorescent nanoparticles, asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura química de um polilactídeo.....	21
Figura 2: Estruturas químicas dos estereoisômeros do lactídeo.	21
Figura 3: Métodos para incorporação de grupos reativos ou funcionais em cadeias poliméricas.	24
Figura 4: Classificação dos tipos de reações de química <i>click</i>	26
Figura 5: Representação esquemática de uma reação de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (I).....	27
Figura 6: Representação esquemática de uma reação de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC).	28
Figura 7: Estrutura molecular do marcador IR780.....	29
Figura 8: Representação esquemática das aplicações descritas na literatura de nanoestruturas contendo o IR780	30
Figura 9: Esquema reacional da polimerização do lactídeo utilizando BCN-OH como iniciador e Sn(Oct) ₂ como catalisador.	35
Figura 10: Esquema reacional da polimerização do lactídeo utilizando BCN-OH como iniciador e TBD como catalisador.....	36
Figura 11: Esquema reacional para a conjugação da 3-(α -azidoacetil)-cumarina ao BCN-PLA via reação de cicloadição azida-alcino.....	37
Figura 12: Esquema reacional para síntese do IR-N ₃	38
Figura 13: Esquema reacional para conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino sem catalisador.	39
Figura 14: Esquema reacional para conjugação do IR780 ao P(LA-co-PGE).....	40
Figura 15: Cromatogramas obtidos por GPC dos polímeros após a reação de cicloadição azida-alcino com a azidocumarina.....	48

Figura 16: Espectros de absorção do marcador fluorescente IR780 e do produto obtido após reação com azida de sódio, em acetonitrila.....	49
Figura 17: Espectros de absorção no UV-VIS-NIR para o IR780 livre e IR-PLA _{4k} ...	50
Figura 18: Cromatogramas obtidos após análise por CLAE-UV do marcador IR780 e dos polímeros conjugados ao IR780 (IR-PLA _{4k} , IR-PLA _{8k} e IR-PLA _{20k}).	51
Figura 19: Comparação entre os cromatogramas dos polímeros conjugados ao IR780, IR-PLA _{4k} (preto), IR-PLA _{8k} (vermelho) e IR-PLA _{20k} (azul).	52
Figura 20: Espectros de ressonância magnética nuclear ¹ H para o IR780.....	53
Figura 21: Espectros de ressonância magnética nuclear ¹ H para o BCN-PLA _{8k} e IR-PLA _{8k}	54
Figura 22: Espectros de excitação e emissão do marcador IR780 em acetonitrila. .	56
Figura 23: Espectros de emissão de fluorescência do IR780 livre e dos polímeros IR-PLA _{4k} e IR-PLA _{8k} , em acetonitrila.....	57
Figura 24: Espectros de fluorescência de nanoesferas contendo IR-PLA _{4k} , em água (A) e em acetonitrila (B).	58
Figura 25: Fractograma das formulações de nanoesfera e nanocápsulas contendo o IR780 conjugado ao PLA associado a diferentes polímeros	59
Figura 26: Fractograma das formulações contendo IR780 encapsulado (preto) e conjugado ao PLA (vermelho).	60
Figura 27: Fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) das formulações contendo IR780 conjugado ao PLA (A) e encapsulado (B), após incubação em DMEM/FBS a 37°C.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de fase móvel utilizado para separação do marcador IR780 livre e conjugado ao PLA.	42
Tabela 2: Relação dos constituintes e suas quantidades necessárias para o preparo de nanoesferas contendo o IR780 encapsulado e conjugado ao PLA.	43
Tabela 3: Polímeros obtidos e suas principais características.....	46
Tabela 4: Caracterização das formulações preparadas em termos de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAC	Reação de cicloadição azida-alcino; reação de cicloadição 1,3-dipolar, do inglês <i>azide-alkyne cycloaddition</i>
AF4	Fracionamento em campo de fluxo assimétrico, do inglês <i>asymmetrical flow field-flow fractionation</i>
Ar	Argônio
BCN-OH	(1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>s</i>)-biciclo-[6.1.0]-non-4-in-9-ilmetanol
BHT	2,6-di-terc-butil-4-metilfenol
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE/UV-Vis	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta-visível
CuAAC	Reação de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (I), do inglês <i>copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
d	Dupleto
Đ	Dispersidade de massa molar; razão entre \bar{M}_w / \bar{M}_n
DCM	Diclorometano
D _g	Diâmetro de giração
D _h	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico da luz, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DV	Desvio padrão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLD	Fluorescência
GPC	Cromatografia de permeação em gel, do inglês <i>gel permeation chromatography</i>
IR780	Iodeto de 2-[2-[2-Cloro-3-[(1,3-di-hidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclo-hexen-1-il]etenilo]-3,3-dimetil-1-propilindolio
IR-N ₃	2-{4-(azido)-7-(1-etil-3,3-dimetil(indolin-2-ilideno))-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il)-1-etil-3,3-dimetil-3H-indolium
LA	Lactídeo; D,L-lactídeo
m	Multiplete
MALS	Espalhamento estático da luz, do inglês <i>multiangle light scattering</i>

\bar{M}_n	Massa molar média numérica
\bar{M}_w	Massa molar média ponderal
NaCl	Cloreto de sódio
N ₃ Cumarina	3-(α -azidoacetil)-cumarina
NC	Nanocápsulas
NIR	Infravermelho próximo, do inglês <i>near infrared</i>
NP	Nanopartículas
NS	Nanoesferas
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PdI	Índice de polidispersão
PDT	Terapia fotodinâmica
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Polilactídeo; poli(ácido láctico)
P(LA-co-PGE)	Poli(lactídeo-co-glicidil propargil éter)
PLGA 50	Poli(lactídeo-co-glicolídeo); poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) constituído de uma proporção, em mol, de lactídeo: glicolídeo de 50:50
PTT	Terapia fototérmica
q	Quarteto
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROP	Polimerização por abertura de anel, do inglês <i>ring opening polymerization</i>
rpm	Rotações por minuto
s	Simpleto
SFB	Soro fetal bovino
Sn(Oct) ₂	2-etil-hexanoato de estanho; octanoato de estanho
SPAAC	Reação de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo, do inglês <i>strain promoted azide-alkyne cycloaddition</i>
t	Tripleto
TBD	1,5,7-triazabicyclo-[4.4.0]-dec-5-eno
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

UV	Ultravioleta
Vis	Visível
δ	Deslocamento químico
ζ	Potencial zeta
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Polilactídeo.....	21
2.2. Funcionalização de cadeias poliméricas	23
2.3. Química <i>click</i>	25
2.3.1. Reação de cicloadição azida-alcino 1,3-dipolar.....	26
2.4. Marcadores fluorescentes da região do infravermelho próximo	28
2.4.1. Marcador fluorescente IR780	29
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo geral	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1. Materiais	34
5.2. Síntese de polilactídeo funcionalizado com grupo alcino cíclico ativado	35
5.2.1. Síntese de BCN-PLA _{8k} catalisada por Sn(Oct) ₂	35
5.2.2. Síntese de BCN-PLA _{8k} catalisada por TBD.....	36
5.3. Avaliação da reatividade do grupamento alcino cíclico presente no BCN-PLA	37
5.5. Síntese de IR-N ₃	38
5.6. Conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo	38
5.7. Conjugação do IR780 a P(LA-co-PGE) via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre	39
5.8. Caracterização dos polímeros.....	40
5.8.1. Cromatografia de permeação em gel	40

5.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	41
5.8.3. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear	42
5.9. Preparo e caracterização de nanopartículas contendo IR780	42
5.9.1. Nanoesferas	42
5.9.2. Nanocápsulas	43
5.10. Caracterização das nanopartículas	44
5.10.1. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	44
5.10.2. Análise da fluorescência	44
5.11. Análise por fracionamento por campo de fluxo assimétrico (AF4)	45
6. RESULTADOS	46
6.1. Síntese e caracterização de polilactídeo com grupamento alcino	46
6.2. Avaliação da reatividade do grupamento alcino cíclico presente no BCN-PLA	47
6.3. Síntese de IR-N ₃	49
6.4. Conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC)	50
6.5. Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H	53
6.6. Conjugação do IR780 ao P(LA-co-PGE) via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre	55
6.7. Preparo e caracterização de nanopartículas	55
6.8. Análise das propriedades fotofísicas por espectrofluorimetria	56
6.9. Análise por AF4-MALS-FLD	59
7. DISCUSSÃO	62
7.1. Síntese, caracterização e avaliação da reatividade de polímeros derivados do polilactídeo contendo grupo alcino reativo	62
7.2. Conjugação do IR780 ao PLA	64
7.4. Preparo e caracterização de nanopartículas contendo o IR-PLA	67
7.4.1. Caracterização por tamanho, Pdl, potencial zeta e fluorescência	67

7.4.2. Avaliação da interação das nanopartículas com proteínas séricas por fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4-MALS-FLD)	68
8. CONCLUSÕES	71
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

O uso de nanocarreadores e seu papel na liberação controlada e direcionada de fármacos e no diagnóstico por imagem tem sido alvo de diversos estudos ao longo das últimas décadas (JOKERST et al., 2011; LI et al., 2017; WANG et al., 2016). As nanopartículas (NP) poliméricas têm se destacado em função da possibilidade de se obter partículas com características físico-químicas distintas de acordo com o tipo de polímero utilizado. Além disso, as NP possuem vantagens, como maior estabilidade em meio biológico e intestinal, quando comparadas aos lipossomas e aos nanocarreadores lipídicos em geral (DISCHER; EISENBERG, 2002).

Dentre os diversos tipos de polímeros utilizados no preparo de nanopartículas, os poliésteres alifáticos, como os derivados de lactonas cíclicas, poli- α -hidroxiácidos como o glicólico e láctico e seus copolímeros, são os de maior interesse devido a suas características biodegradáveis e biocompatíveis (YU; ZOU; CHENG, 2014).

Polilactídeos (PLA) se destacam entre os demais polímeros por serem biocompatíveis e biodegradáveis, sendo utilizados há bastante tempo na produção de próteses e implantes, na engenharia de tecidos e no preparo de nanopartículas para entrega direcionada de fármacos (SAINI; ARORA; KUMAR, 2016).

Apesar do PLA apresentar características de grande interesse na área biomédica, a sua utilização no Brasil é dificultada frente ao seu alto custo, uma vez que esse polímero e seus derivados não são produzidos por nenhuma empresa nacional. Além disso, para aplicações em vetorização é necessário o preparo de polímeros com alta pureza e estrutura química específica que garanta sua inocuidade em estudos pré-clínicos, performance na liberação controlada e reprodutibilidade quando utilizado para o preparo de nanocarreadores poliméricos.

Atualmente, os estudos de desenvolvimento de nanocarreadores têm sido realizados visando a obtenção de nanopartículas funcionalizadas, por meio da ligação covalente com ligantes de reconhecimento celular e substâncias bioativas à cadeia dos polímeros que constituem tais partículas. Visando assim obter uma entrega direcionada da “carga” do ativo além da possibilidade de rastreamento das partículas nas células e tecidos (YU et al., 2011; ROBB et al., 2012; XIE et al., 2013).

Para a obtenção de PLA funcionalizados é necessária a incorporação de grupos reativos ao longo da cadeia polimérica seguida da ligação de moléculas ativas à cadeia.

Devido à sua alta eficiência e rendimento, as reações *click* vem sendo amplamente empregadas para a modificação de cadeias poliméricas, conforme revisado por Akeroyd e Klumperman (2011). A inserção de grupos alcino ou azida ao longo da cadeia polimérica permite a utilização da química *click* para a conjugação de ligantes, sondas fluorescentes e substâncias bioativas a polímeros, sem causar interferência nas etapas de polimerização, seja por via radicalar ou por abertura de anel. Além disso, o uso da química *click* se justifica diante da dificuldade de purificação de polímeros, devido à alta dispersidade de massas molares.

Dentre as moléculas utilizadas para funcionalização de polímeros, sondas com excitação e emissão de fluorescência na região do infravermelho próximo (NIR, 750 – 1000 nm) são de grande interesse no desenvolvimento de novas técnicas de imagem e diagnóstico. Nos comprimentos de onda que englobam a janela espectral do NIR, a absorção e autofluorescência de tecidos vivos é baixa, sendo assim chamada de “janela de transparência biológica”. Além disso, a penetração de luz com esses comprimentos de onda é muito mais profunda do que no ultravioleta ou visível, o que facilita a detecção por técnica imagem em animais vivos e evita a interferência com agentes externos (NOTTELET; DARCOS; COUDANE, 2015).

O IR780 é uma sonda fluorescente lipofílica, que apresenta absorção máxima em 780 nm e emissão de fluorescência em 817 nm. Além de suas propriedades fluorescentes, que podem ser aplicadas em imagem e diagnóstico, diversos estudos têm demonstrado a capacidade do IR780 de promover citotoxicidade fotodependente. Quando irradiado com laser (808 nm), o IR780 é capaz de promover a formação de espécies reativas de oxigênio e o aumento da temperatura do meio, sendo amplamente estudado para aplicação em terapia fotodinâmica (PDT) e fototérmica (PTT) (PAIS-SILVA; DE MELO-DIOGO; CORREIA, 2017; WANG et al., 2011).

Apesar de sua promissora atividade terapêutica, o uso do IR780 é limitado devido à alta hidrofobia e toxicidade, além de apresentar baixa fotoestabilidade em meio aquoso (SAMANTA et al., 2010). Para contornar essa limitação, associação do IR780 a nanocarreadores é uma estratégia interessante para melhorar suas características de solubilidade, estabilidade (JIANG et al., 2015; LI et al., 2016) e reduzir a toxicidade (JIANG et al., 2015).

Além de poder atuar como um agente fotossensibilizador, utilizado em terapias fotodinâmica e fototérmica, o IR780 pode ser empregado em estudos pré-clínicos para

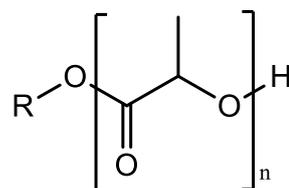
auxílio na avaliação da biodistribuição de nanopartículas, uma vez que a inserção de marcadores fluorescentes em nanocarreadores permite confirmação visual do destino dessas partículas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar polímeros derivados de um lactídeo e funcionalizá-los com o marcador IR780, por meio de ligação covalente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Polilactídeo

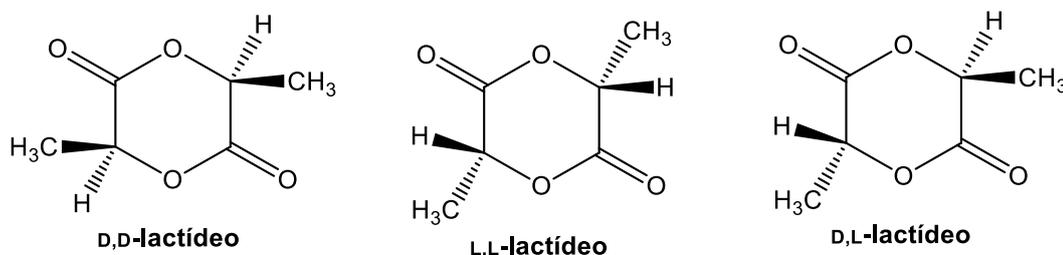
Poli(ácido láctico) (PLA) (Fig. 1), também denominados como polilactídeos, são polímeros da classe dos poliésteres alifáticos compostos por unidades repetidas de ácido láctico (α -ácido 2-hidroxiopropanóico).

Figura 1: Representação da estrutura química de um polilactídeo.



A condensação de duas moléculas de ácido láctico dá origem a um dímero cíclico denominado de lactídeo (3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona). Devido à presença de um átomo de carbono quiral na sua estrutura química, o ácido láctico pode ser encontrado como L- ou D-ácido láctico. Assim, três estereoisômeros do lactídeo (LA) podem ser obtidos (Fig. 2), dois sob a forma homoquiral (L,L- ou D,D-LA), que são opticamente ativos, e um na forma heteroquiral (D,L-LA), inativo opticamente e denominado de meso-lactídeo (PRETULA; SLOMKOWSKI; PENCZEK, 2016). Desse modo, a estrutura estereoquímica do PLA irá variar de acordo com o tipo de dímero que é utilizado para a polimerização. Para o uso em nanocarreadores o poli(D,L-LA) é o mais comumente utilizado devido à sua baixa cristalinidade.

Figura 2: Estruturas químicas dos estereoisômeros do lactídeo.



A principal via de síntese do polilactídeo é a polimerização por abertura de anel (ROP). Essa via permite a obtenção de uma variedade de polímeros com características distintas, em termos de composição e estrutura da cadeia em função do monômero utilizado, polaridade, massa molar e cristalinidade (PRETULA; SLOMKOWSKI; PENCZEK, 2016).

A ROP do lactídeo pode ser realizada utilizando catalisadores metálicos ou orgânicos. Dentre os catalisadores que atuam pelo mecanismo de coordenação-inserção, o estanho (II) (Sn(II)), gerado a partir do octanoato de estanho (Sn(Oct)₂), é um dos mais estudados e conhecidos por gerarem polímeros com massa molar elevada, sendo um dos mais empregados na produção de polilactídeos, inclusive em escala industrial. Apesar de muitos autores alegarem que sua utilização é inadequada devido à toxicidade desse metal, o Sn(II) é aprovado pela agência regulatória norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) (PRETULA; SLOMKOWSKI; PENCZEK, 2016; YU; ZOU; CHENG, 2014).

Os catalisadores orgânicos, como o 1,5,7-triazabicyclo-[4.4.0]-dec-5-eno (TBD), 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno (DBU) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP), atuam na polimerização por um mecanismo nucleofílico, promovendo um bom controle sobre a estrutura do polímero obtido. Devido a elevada reatividade dos catalisadores orgânicos em relação aos catalisadores metálicos, as polimerizações organocatalisadas ocorrem em segundos à baixas temperaturas, tipicamente de -10 a 25°C (KIESEWETTER et al., 2009; PRATT et al., 2006; YU; ZOU; CHENG, 2014). Porém, as reações organocatalisadas são mais sensíveis à presença de impurezas como água, resultando em massas molares mais baixas quando comparado às reações catalisadas pelo Sn(Oct)₂.

O PLA é um polímero de grande interesse na área biomédica, sendo utilizado há bastante tempo na produção de próteses e implantes, na engenharia de tecidos e no preparo de nanopartículas para entrega direcionada de fármacos, por ser um polímero biocompatível e biodegradável (SAINI; ARORA; KUMAR, 2016). Além disso, o PLA é o único polímero produzido em escala industrial que apresenta essas características, sendo a Cargill Inc. a primeira e maior indústria a produzir PLA, com diferentes propriedades (PRETULA; SLOMKOWSKI; PENCZEK, 2016).

O caráter hidrofóbico do PLA faz com que este polímero seja um excelente candidato para o encapsulamento de fármacos que possuem baixa solubilidade em

água, melhorando a dispersibilidade desses em meios biológicos. Nanocarreadores à base de PLA são utilizados para o encapsulamento de substâncias antitumorais para o tratamento de diversos tipos de câncer, peptídeos e proteínas usados no desenvolvimento de vacinas e agentes de imagem (TYLER et al., 2016).

Apesar de favorecer o encapsulamento de substâncias lipofílicas, o carácter hidrofóbico do PLA induz à opsonização das partículas após administração endovenosa e sua rápida eliminação da circulação sanguínea por células do sistema fagocítico mononuclear (BERTRAND; LEROUX, 2012). Por isso, as nanopartículas de PLA são comumente revestidas com polietilenoglicol (PEG), um polímero de carácter hidrofílico. O PEG pode estar apenas adsorvido à superfície das nanopartículas, pelo uso de um surfactante, ou ligado covalentemente a cadeia de PLA, formando um copolímero em bloco denominado de polietilenoglicol-*b*-polilactídeo (PEG-PLA).

A associação do PEG ao PLA é capaz de modificar a biodistribuição de nanopartículas, e conseqüentemente do fármaco encapsulado. A presença do PEG na superfície das partículas resulta em uma estabilização estérica que previne a adsorção de proteínas à superfície da partícula polimérica e reduz a eliminação pelas células fagocitárias (MOSQUEIRA et al., 2001). Assim há um aumento do tempo de circulação sanguínea, que altera *in vivo* a biodistribuição dos ativos associados a esses nanocarreadores estericamente estabilizados.

2.2. Funcionalização de cadeias poliméricas

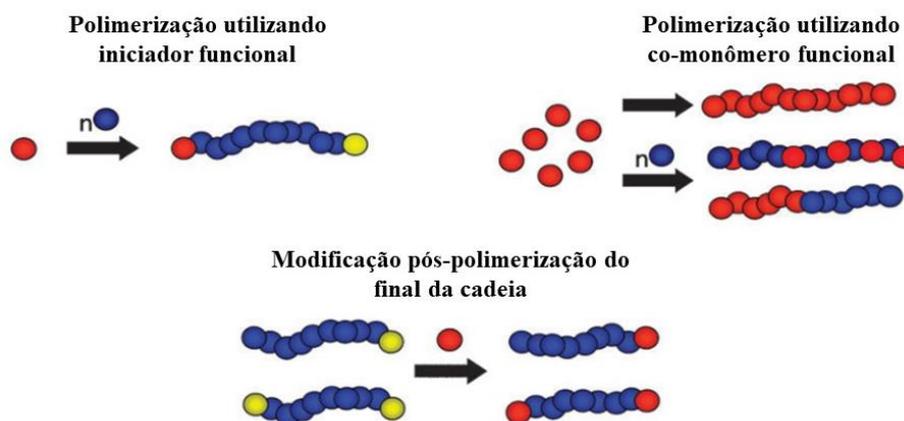
A funcionalização de cadeias poliméricas com biomoléculas vem sendo amplamente estudada na área biomédica. A inserção de ligantes de reconhecimento celular e substâncias bioativas (fármacos, proteínas, agentes de imagem e diagnóstico) ao longo de cadeias poliméricas é uma estratégia utilizada no desenvolvimento de nanocarreadores, visando a obtenção de uma entrega direcionada do ativo, mas também usada para o rastreamento dessas partículas em células e tecidos (YU et al., 2011; ROBB et al., 2012; XIE et al., 2013).

Apesar de ser possível encontrar uma grande variedade de trabalhos na literatura sobre a funcionalização de polímeros, não se trata de método trivial, pois envolve muitas vezes esquemas complexos de síntese orgânica, sendo que cada metodologia disponível possui suas limitações dependendo do monômero e técnica de polimerização envolvida. Para a funcionalização do PLA e PLA-PEG onde o bloco

PLA é obtido por ROP, a inserção de grupamentos reativos na cadeia polimérica pode ser realizada aplicando-se três estratégias distintas (Fig. 3). Como é de interesse para o presente trabalho, são discutidas a seguir as estratégias para a inserção de grupamento alcino em cadeias de PLA. Vale ressaltar que o grupo alcino não interfere com o processo de ROP e oferece a possibilidade de realizar reações de química *click* (EL HABNOUNI et al., 2011), sendo de grande relevância para a funcionalização de NP à base de PLA.

A primeira estratégia consiste em uma copolimerização utilizando um co-mônômero reativo ou que já contenha um grupo funcional, o que permite, a princípio, a inserção de mais de um grupo funcional por cadeia. Essa estratégia foi utilizada por Pound-Lana e colaboradores (2017), entre outros, que desenvolveram uma rota sintética para a produção de copolímero em bloco de polietilenoglicol-*bloco*-poli(lactídeo-*co*-glicidil proprargil éter) (PEG-*b*-P(LA-*co*-PGE)), com a finalidade de se obter uma plataforma para a funcionalização desses polímeros. Os autores utilizaram a presença de grupos alcino terminais ao longo da cadeia polimérica para a conjugação de um marcador fluorescente contendo grupo azida via reação de cicloadição 1,3-dipolar.

Figura 3: Métodos para incorporação de grupos reativos ou funcionais em cadeias poliméricas.



Fonte: Adaptado de Golas e Matyjaszewski (2010)

A segunda abordagem se baseia na funcionalização do final da cadeia polimérica, através do uso de um iniciador reativo ou funcional. Van Den Berg, Zuilhof e Wennekes (2016) utilizaram iniciadores reativos contendo grupos ciclooctila e

tetrazina para sintetizar polilactídeos que pudessem ser utilizados em química *click*. Uma das aplicações avaliadas pelos autores foi a síntese de copolímeros em bloco de PEG-PLA, utilizando o polietilenoglicol contendo o grupo azida (PEG_{5k}-N₃) e um PLA contendo o grupo ciclooctila.

A terceira metodologia que pode ser utilizada é a modificação pós-polimerização do final da cadeia, que consiste na derivatização de grupos terminais de um polímero pré-formado. O final de cadeia em posição ômega de um polímero obtido por ROP do lactídeo consiste em um grupo hidroxila de reatividade moderada, que pode ser utilizado para realização de modificações químicas. Essa estratégia foi utilizada por Liénard e colaboradores, que inseriram um grupo alcino terminal a uma cadeia de PLA por reação com o anidrido pentinóico (LIÉNARD et al., 2016).

A pós-funcionalização acrescenta uma etapa a mais no processo de síntese dos polímeros, além de exigir uma nova etapa de purificação após a funcionalização. O rendimento do processo de transformação do grupo de final de cadeia precisa ser elevado, pois a separação entre as cadeias poliméricas funcionalizadas e não-funcionalizadas pode ser difícil de ser realizada. Esse método não garante a presença do grupo funcional desejado em todas as cadeias poliméricas (GOLAS; MATYJASZEWSKI, 2010).

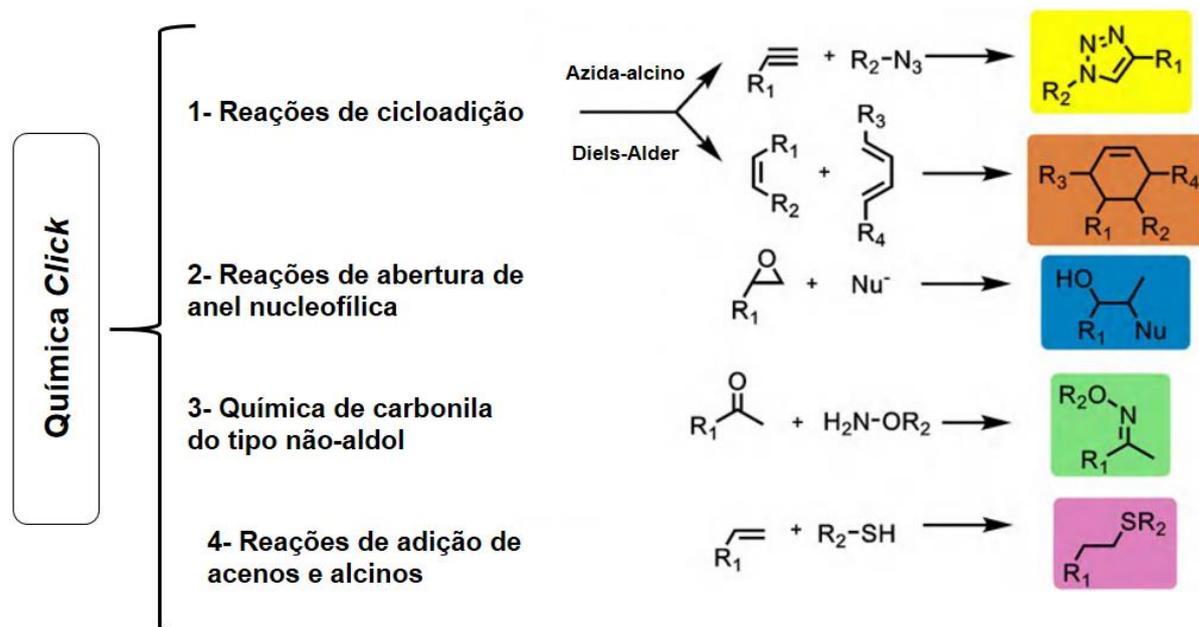
2.3. Química *click*

O conceito de química *click* foi definido por Sharpless e colaboradores em 2001 e compreende um conjunto de reações “termodinamicamente favoráveis”, que necessitam de condições reacionais simples e são capazes de gerar produtos com altos rendimentos. Além disso, para uma reação ser considerada como química *click* ela precisa ser modular, de amplo alcance, gerar apenas subprodutos inofensivos, que possam ser facilmente removidos por métodos não cromatográficos (recristalização e destilação), ser estereoespecífica, utilizar reagentes de fácil acesso, não utilizar solventes ou utilizar solventes que são facilmente removidos e permitir o isolamento do produto de maneira simples (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

As reações de química *click* podem ser classificadas em quatro tipos (Fig. 4): (1) reações de cicloadição, que englobam as reações de cicloadição 1,3-dipolar e hetero-Diels-Alder; (2) reações de abertura de anéis nucleofílicos, como abertura de

heterociclos tensos (aziridinas, epóxidos e sulfatos cíclicos); (3) química de carbonila do tipo não-aldol, que inclui as formações de ureias, tioureias, hidrazonas, éteres de oxima, amidas e heterociclos aromáticos; (4) adições a ligações múltiplas carbono-carbono, que incluem epoxidações, aziridinações, di-hidroxilações, adições de halogeneto de sulfenilo, adições de halogeneto de nitrosilo e certas adições de Michael (HEIN; LIU; WANG, 2008).

Figura 4: Classificação dos tipos de reações de química *click*.



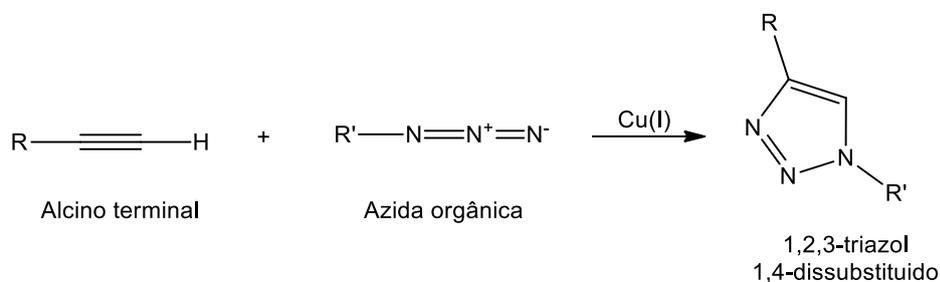
Fonte: Adaptado de Tasdelen, Kiskan e Yagci (2016)

2.3.1. Reação de cicloadição azida-alcino 1,3-dipolar

A reação de cicloadição 1,3-dipolar, também denominada de cicloadição azida-alcino, foi inicialmente descrita por Huisgen em 1967 e ocorre a partir de um alcino terminal e uma azida orgânica para a formação de um anel 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído (Fig.5) (HUISGEN; SZEIMIES; MÖBIUS, 1967). A reação inicialmente proposta por Huisgen apresentava baixo rendimento, geração de produtos secundários e condições extremas para sua ocorrência, como a necessidade de altas temperaturas e longos tempos de reação. Esta reação passou a ter importância sintética com a introdução do cobre (I) como catalisador, que possibilitou a execução dessa reação em condições mais brandas e com altos rendimentos. Desse modo, a cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) (CuAAC) passou a ser considerada

como um tipo de reação *click* (DERVAUX; DU PREZ, 2012; ROSTOVTSEV et al., 2002).

Figura 5: Representação esquemática de uma reação de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (I).

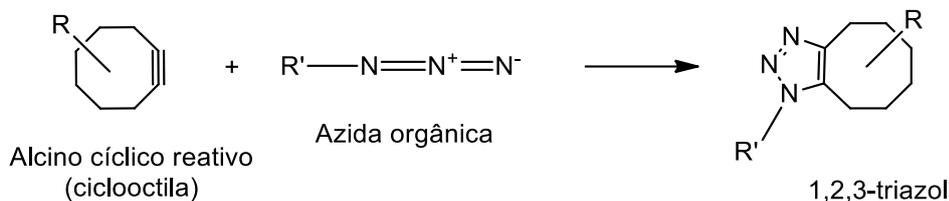


O alto rendimento dessas reações associado à dificuldade de purificação de polímeros fez com que a reação de cicloadição 1,3-dipolar fosse utilizada para a funcionalização de cadeias poliméricas, sem interferir com as etapas de polimerização. A reação CuAAC pode ser empregada na conjugação de substâncias ativas a cadeias poliméricas, como marcadores fluorescentes (EL HABNOUNI et al., 2011; MORTON et al., 2014) e peptídeos (LUTZ; BÖRNER; WEICHENHAN, 2006), formação de copolímeros em bloco (LEOPHAIRATANA; DE SILVA; KOBERSTEIN, 2018), modificação da superfície de nanopartículas poliméricas com moléculas que promovem o direcionamento ativo (KROVI; SMITH; NGUYEN, 2010), entre outros.

Apesar do cobre (I) ser um dos catalisadores mais empregados em reações CuAAC, sua utilização em reações de bioconjugação e imagem *in vivo* é considerada inadequada devido à natureza tóxica desse metal (DERVAUX; DU PREZ, 2012; HEIN; LIU; WANG, 2008).

Uma reação livre de cobre que vem sendo utilizada é a cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC), que consiste na utilização de grupos alcino cíclicos reativos (ciclooctila) (Fig. 6). Essa reação foi descrita primeiramente por Witting e Krebs em 1961 (*apud* AGARD; PRESCHER; BERTOZZI, 2004) ao observarem que a reação entre uma ciclooctila e uma fenil-azida “ocorria como uma explosão”, fornecendo um triazol como único produto. A SPAAC se baseia no conceito de tensão de anel, que acelera a reação entre uma azida e um anel ciclooctila (ZOU et al., 2018). Desse modo, essas reações são capazes de formar anéis triazóis de maneira rápida, em temperatura ambiente e sem o uso de catalisador (WANG et al., 2014).

Figura 6: Representação esquemática de uma reação de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC).



As reações de SPAAC são utilizadas para preparar polímeros topológicos (WANG et al., 2014; ZHU et al., 2016), copolímeros em bloco, polímeros conjugados a marcadores fluorescentes (VAN DEN BERG; ZUILHOF; WENNEKES, 2016), polímeros conjugados a ligantes biológicos (HUDLIKAR et al., 2016), funcionalização de nanofibras poliméricas com partículas de ouro (ZHENG et al., 2012), entre outras aplicações. Por ser uma reação *click* livre de cobre, a SPAAC vem sendo utilizada em reações bio-ortogonais para modificação de biomoléculas em sistemas vivos (AGARD; PRESCHER; BERTOZZI, 2004; TIAN; SAKMAR; HUBER, 2016). Grande vantagem dessa abordagem é a total ausência de subprodutos de reação ou contaminante sendo realizada com eficiência em átomos de 100%.

2.4. Marcadores fluorescentes da região do infravermelho próximo

A fluorescência é um fenômeno foto-físico que consiste na emissão de radiação eletromagnética, que ocorre quando uma molécula excitada retorna ao seu estado fundamental. A emissão da fluorescência pode ocorrer nas regiões do ultravioleta (UV), visível (Vis) ou infravermelho próximo (NIR), dependendo da estrutura química do fluorocromo.

As moléculas que possuem excitação e emissão de fluorescência na região do NIR (750 – 1000 nm) são de grande interesse nas técnicas de imagem e diagnóstico, pois nessa janela espectral a absorção e autofluorescência de tecidos vivos é baixa o que evita a interferência com agentes externos e principalmente porque a penetração da luz NIR nos tecidos é maior, o que facilita a detecção em animais vivos (YEN et al., 2013; NOTTELET; DARCOS; COUDANE, 2015).

Dentre as moléculas que apresentam fluorescência na região do NIR, as indocianinas são as mais conhecidas e estudadas, sendo a indocianina verde (ICG)

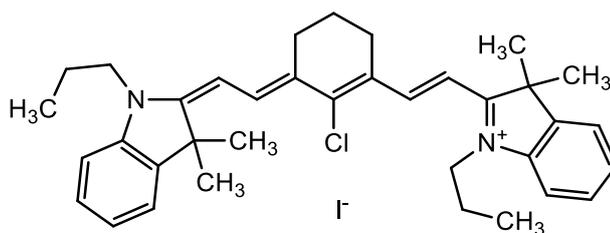
aprovada pela FDA para a utilização como contraste em técnicas de diagnóstico (PAIS-SILVA; DE MELO-DIOGO; CORREIA, 2017). No entanto, como a ICG apresenta baixa solubilidade em água e baixa estabilidade na presença de luz, novas moléculas derivadas vêm sendo desenvolvidas para contornar essas limitações (SAMANTA et al., 2010).

Dentre os derivados das cianinas disponíveis, o marcador IR780 vem se destacando por apresentar maior estabilidade e intensidade de fluorescência, quando comparado com a ICG (ZHANG et al., 2010).

2.4.1. Marcador fluorescente IR780

O marcador iodeto de 2-[2-[2-cloro-3-[(1,3-di-hidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclo-hexen-1-il]etenilo]-3,3-dimetil-1-propilindolio, conhecido como IR780 (Fig. 7), é uma cianina heptametina catiônica, que apresenta uma forte absorção e emissão na região do infravermelho próximo, com elevado coeficiente de extinção molar ($2.65\text{--}3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em 780 nm (ALVES et al., 2018).

Figura 7: Estrutura molecular do marcador IR780.



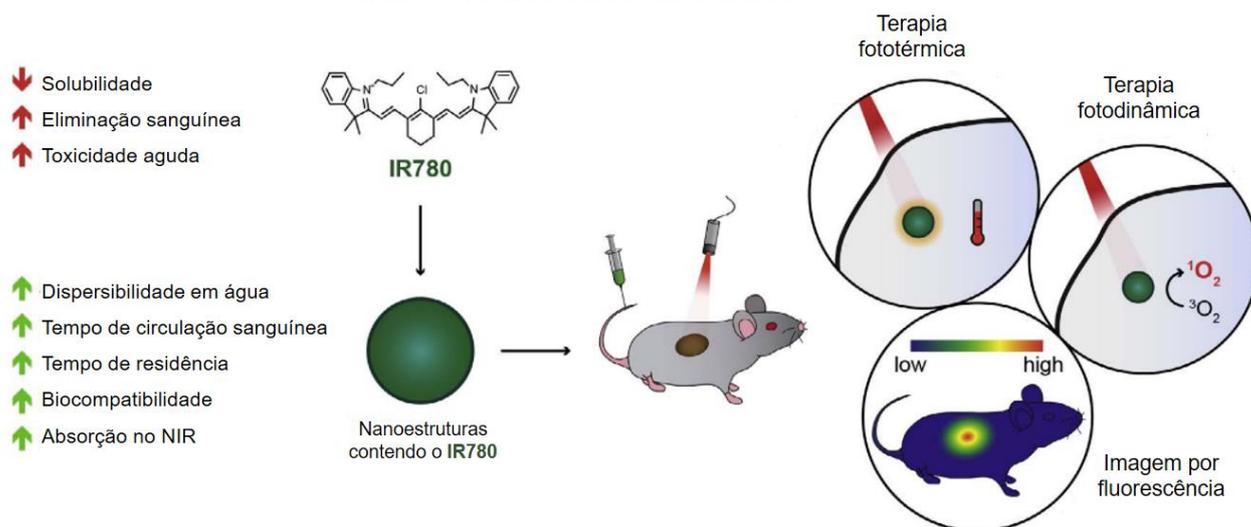
Devido a suas propriedades de fluorescência, o IR780 pode ser aplicado em técnicas de imagem e diagnóstico, incluindo técnicas de imagem *in vivo* (LI et al., 2017; TAN et al., 2012). Além disso, quando irradiado com luz laser (808 nm), o IR780 é capaz de promover a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o aumento da temperatura do meio com alta eficiência, promovendo um efeito citotóxico fotodependente. Por isso, esse marcador vem sendo amplamente estudado para aplicação em terapia fotodinâmica e fototérmica (PAIS-SILVA; DE MELO-DIOGO; CORREIA, 2017; WANG et al., 2016). Por apresentar propriedades que permitem o

diagnóstico e o tratamento de maneira simultânea, o IR780 é denominado como um teranóstico.

Além da atividade citotóxica, Zhang e colaboradores (2010) demonstraram que o IR780 é capaz de uma acumulação preferencial em mitocôndrias de células de tumores xenográficos em camundongos nude e tumores de pulmão induzidos quimicamente em camundongos C57BL.

Apesar dessas propriedades apresentadas pelo IR780, que o tornam um promissor agente terapêutico no câncer, sua utilização é limitada devido a sua característica hidrofóbica (solubilidade em água: 0,4µg/mL) e toxicidade (doses maiores que 1mg/kg em ratos), além de apresentar baixa fotoestabilidade em meio aquoso (SAMANTA et al., 2010). Para contornar essas limitações e melhorar suas características de solubilidade e estabilidade fotofísica, foram utilizados nanocarreadores para encapsular o IR780 e a realização de modificações estruturais na molécula do marcador (JIANG et al., 2015; LI et al., 2016). A figura 8 resume as principais características do IR780, as vantagens de sua associação a nanoestruturas e suas aplicações na fototerapia do câncer e em imagem e diagnóstico, conforme revisado por Alves e colaboradores (2018).

Figura 8: Representação esquemática das aplicações descritas na literatura de nanoestruturas contendo o IR780



Fonte: Adaptado de Alves e colaboradores (2018).

O IR780 já foi encapsulado em diversos tipos de nanocarreadores, entre eles nanopartículas de transferrina (WANG et al., 2016), micelas (PAIS-SILVA; DE MELO-DIOGO; CORREIA, 2017), nanopartículas de albumina (HAN et al., 2017), lipossomas (YANG et al., 2018), carreadores lipídicos nanoestruturados (LI et al., 2016), nanoesferas e nanocápsulas de PLA e poli- ϵ -caprolactona (PCL) (BAZYLIŃSKA et al., 2014; PIETKIEWICZ; WILK; BAZYLIŃSKA, 2016) entre outros.

A presença do átomo de cloro na molécula de IR780 faz com que esse marcador seja a única cianina reativa disponível comercialmente, que pode ser obtida em grande escala. Ele permite que sejam feitas modificações químicas na estrutura do IR780 para conjugação a outras moléculas, sendo essa uma rota conveniente para obtenção de nanocarreadores teranósticos baseados nesse marcador (Yi et al., 2016).

Yuan e colaboradores (2015) modificaram o átomo de cloro da molécula de IR780, inserindo uma cadeia de PEG_{2k}, e modificaram a cadeia carbônica lateral, inserindo uma cadeia carbônica contendo treze átomos de carbono (C13). Além de melhorar a dispersibilidade do IR780, os autores obtiveram uma molécula (PEG-IR780-C13) capaz de se auto-organizar como micelas, que foram empregadas para terapia fototérmica e imagem *in vivo*.

Palao-Suay e colaboradores (2017) conjugaram a molécula de IR780 em um copolímero em bloco de polietilenoglicol e um derivado metacrilato do succinato de α -tocoferol (PEG-*b*-poliMTOS), visando a obtenção de um sistema polimérico que possuísse propriedades fototérmicas, fotodinâmicas e de direcionamento para tumores. Nesse sistema, o IR780 está presente na superfície das nanopartículas, sendo possível encapsular uma quantidade adicional do marcador.

Lin e colaboradores (2017) conjugaram o IR780 ao ácido hialurônico para obtenção de um sistema auto-organizável aplicado na terapia fototérmica em câncer de bexiga com super-expressão de CD44 (receptor de ácido hialurônico).

Estes trabalhos demonstram que modificações químicas podem ser realizadas na molécula de IR780, sem que haja prejuízo de suas propriedades fotofísicas e como fotossensibilizador na PDT/PTT.

3. JUSTIFICATIVA

A conjugação de um marcador fluorescente da região do infravermelho próximo, como o IR780, ao polilactídeo por meio de uma ligação covalente permite a obtenção de um polímero funcional que pode ser utilizado no preparo de nanocarreadores para a realização de estudos pré-clínicos por imagem *in vitro* e estudos de biodistribuição *in vivo*. O uso desses polímeros permite a determinação mais precisa do destino das nanopartículas usando técnicas de imagem, devido à ligação mais estável entre a sonda fluorescente e o nanossistema. Além disso, devido às características da sonda utilizada, que é também um fotossensibilizador, os polímeros obtidos podem ser aplicados em terapia fotodinâmica e fototérmica no tratamento de tumores.

Para essa finalidade é essencial o uso de uma molécula com forte excitação e emissão na região do infravermelho próximo, para que haja uma maior penetração da luz nos tecidos e menor interferência da autofluorescência dos tecidos para efeito de diagnóstico, e a sua ligação covalente ao polímero para garantir a manutenção da sua associação ao nanocarreador após administração *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Sintetizar polímeros derivados do lactídeo funcionalizados com um marcador fluorescente com excitação e emissão de fluorescência no infravermelho próximo, visando à obtenção de produtos que possam ser utilizados no preparo de nanopartículas a serem avaliadas posteriormente em estudos pré-clínicos de biodistribuição por técnicas de imagem.

4.2. Objetivos específicos

- Obter uma rota sintética otimizada para a síntese de polímeros derivados do lactídeo funcionalizados com grupamento alcino reativo em escala adequada para a avaliação *in vitro* e *in vivo* de nanocarreadores (0,1 a 1 g);
- Caracterizar os polímeros sintetizados em termos de massa molar, dispersidade e inserção dos grupamentos funcionais;
- Avaliar a reatividade do grupamento alcino em função da massa molar do polímero;
- Obter uma rota sintética otimizada para a conjugação do marcador fluorescente IR780 aos polímeros derivados do lactídeo;
- Caracterizar os polímeros conjugados ao IR780 em termos de inserção do marcador na cadeia polimérica;
- Preparar e caracterizar nanopartículas a partir dos polímeros conjugados com o marcador IR780;
- Avaliar as propriedades de fluorescência das nanopartículas preparadas;
- Avaliar a interação das nanopartículas contendo o IR780 conjugado ao PLA com proteínas séricas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais

O 3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona (D,L-lactídeo, Sigma, 98%) foi purificado por três recristalizações sucessivas utilizando tolueno anidro, seco sob alto vácuo e armazenado em atmosfera de argônio. O diclorometano anidro (DCM, Aldrich, 99%) foi armazenado com peneiras moleculares de 3Å e degaseificado sob um fluxo de argônio durante 30 min antes da utilização em polimerizações. Os catalisadores 1,5,7-triazabicyclo-[4.4.0]-dec-5-eno (TBD, Sigma-Aldrich, 98%) e 2-etil-hexanoato de estanho (II) (Sn(Oct)₂, Sigma 95%) e o iniciador (1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo-[6.1.0]-non-4-in-9-ilmetanol (BCN-OH, Aldrich) foram purificados por destilação azeotrópica de tolueno anidro e utilizados imediatamente. Tetraidrofurano de grau HPLC (THF, J.T.Baker) foi estabilizado com 250 ppm de 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT, Sigma-Aldrich). Dimetilformamida anidra (DMF, Sigma) foi destilada e armazenada sob argônio. Iodeto de 2-[2-[2-cloro-3-[(1,3-di-hidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclo-hexen-1-il]etenilo]-3,3-dimetil-1-propilindolio (IR780, Aldrich 98%), azida de sódio (Sigma, 99,5%), N,N,N',N'',N'''-pentametildietilenetriamina (PMDETA, Aldrich 99%), brometo de cobre (I) (CuBr, Sigma- Aldrich, ≥98.0%), Lipoid® S75 (Lipoid), Miglyol® 812N (Sasol), Pluronic® F68 (Sigma-Aldrich), polilactídeo-co-glicolídeo 50:50 (PLGA 50, \bar{M}_n : 45.000g/mol, Sigma-Aldrich), poli-ε-caprolactona (PCL, \bar{M}_n : 65.000 g/mol, Sigma-Aldrich), os solventes tolueno anidro (Aldrich, 99%), diclorometano grau PA, hexano, propan-2-ol e acetona (Vetec) foram utilizados como recebidos. Os polímeros polilactídeo (PLA, \bar{M}_n : 8600 g/mol; \bar{D} : 1,26), os copolímeros de polilactídeo com polietilenoglicol PEG_{5k}-PLA_{20k} (\bar{M}_n : 23200; \bar{D} : 1,33 e \bar{M}_n : 22.200 g/mol; \bar{D} : 1,38) e o copolímero de polilactídeo com glicidil propargil éter (PLA-co-PGE com 1,5% molar de PGE; \bar{M}_n : 11.600 g/mol; \bar{D} : 1,7) foram previamente sintetizados em nosso grupo de pesquisa de acordo com metodologia descrita em Pound-Lana et al. (2017).

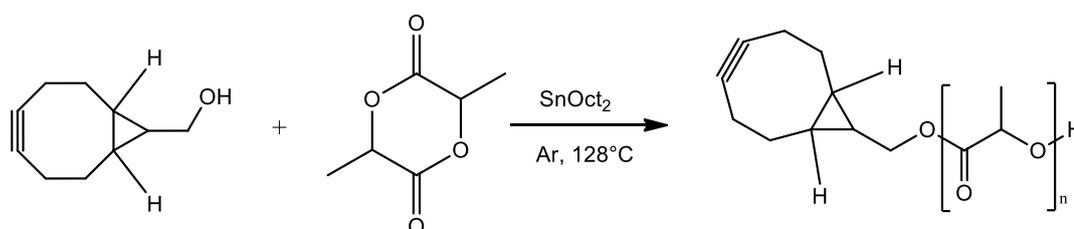
5.2. Síntese de polilactídeo funcionalizado com grupo alcino cíclico ativado

Para a obtenção de polilactídeos funcionalizados com grupo alcino cíclico ativado (BCN-PLA) foi utilizado um iniciador contendo o grupamento reativo ciclooctila (BCN-OH). O D,L-lactídeo foi polimerizado por abertura de anel, utilizando como catalisador o Sn(Oct)₂ ou o TBD. O Sn(Oct)₂ necessita de temperaturas relativamente altas (acima de 100°C) para a polimerização do LA, podendo ser realizada em massa (na ausência de solvente), ao passo que o TBD, muito mais reativo, deve ser utilizado em temperaturas baixas (até 25°C) e conseqüentemente usando-se um solvente orgânico para a obtenção de uma mistura reacional homogênea. As metodologias específicas de síntese utilizando cada um dos catalisadores estão descritas a seguir.

5.2.1. Síntese de BCN-PLA_{8k} catalisada por Sn(Oct)₂

A reação de polimerização por abertura de anel catalisada por Sn(Oct)₂ foi realizada conforme procedimento adaptado de Pound-Lana e colaboradores (2017) (Fig. 9).

Figura 9: Esquema reacional da polimerização do lactídeo utilizando BCN-OH como iniciador e Sn(Oct)₂ como catalisador.



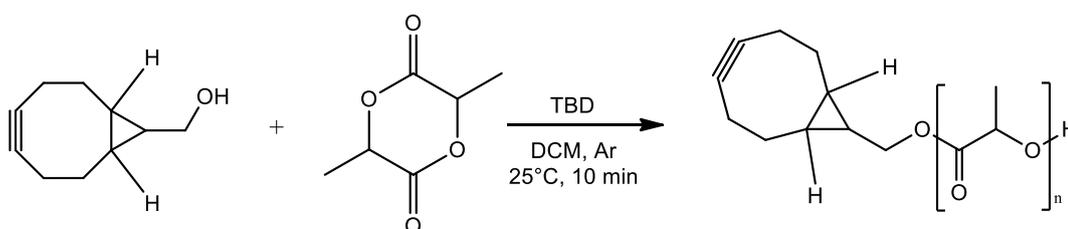
O iniciador BCN-OH (5,6 mg; 0,037 mmol) foi adicionado a um balão de fundo redondo e seco por destilação azeotrópica com tolueno anidro (3 mL). O catalisador Sn(Oct)₂ (13,3 µL; 0,037 mmol) foi adicionado junto ao BCN-OH e estes foram submetidos a uma nova etapa de secagem por destilação azeotrópica com tolueno anidro (3 mL). O D,L-lactídeo (300 mg; 2,1 mmol) foi adicionado junto ao BCN-OH e Sn(Oct)₂. O balão foi equipado com uma barra magnética e vedado com septo de borracha. Foram aplicados cinco ciclos de vácuo/argônio. Após a obtenção de uma atmosfera inerte dentro do balão, o mesmo foi submetido a aquecimento em banho de óleo a 128°C (temperatura interna de 120°C). A reação foi mantida sob agitação

magnética até que o meio reacional apresentasse uma alta viscosidade. O balão foi retirado do banho de óleo e mantido a 25°C para redução da temperatura. Para a purificação o polímero foi dissolvido em diclorometano (2 mL), precipitado em hexano (15 mL), solubilizado em diclorometano (2 mL), precipitado em isopropanol (15 mL) e o solvente residual foi removido sob alto vácuo.

5.2.2. Síntese de BCN-PLA_{8k} catalisada por TBD

A polimerização por abertura de anel organocatalisada foi realizada conforme procedimento adaptado de Van Den Berg, Zuilhof e Wennekes (2016) (Fig. 10).

Figura 10: Esquema reacional da polimerização do lactídeo utilizando BCN-OH como iniciador e TBD como catalisador.



O catalisador TBD (5,3 mg; 0,035 mmol) foi adicionado a um balão de fundo redondo e seco por destilação azeotrópica com tolueno anidro (3 × 5 mL). O iniciador BCN-OH (5,6 mg; 0,037 mmol) foi adicionado junto ao TBD e estes foram submetidos a uma nova etapa de secagem por destilação azeotrópica com tolueno anidro (5 mL). O D,L-lactídeo recristalizado (300 mg; 2,1 mmol) foi adicionado em um segundo balão. Os balões foram vedados com septos de borracha e foram aplicados cinco ciclos de vácuo/argônio em cada balão. Após a obtenção de uma atmosfera inerte, foram adicionados 1,0 e 3,0 mL de diclorometano anidro e degaseificado aos balões contendo BCN-OH e TBD e o lactídeo, respectivamente.

Após a solubilização dos reagentes, a solução de lactídeo foi adicionada junto ao BCN-OH e ao TBD sob agitação magnética, com o auxílio de uma seringa seca e em atmosfera inerte. A reação foi mantida sob agitação magnética durante 10 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 0,5 mL de uma solução de ácido benzoico em DCM (10 mg/mL) ao balão para desativar o catalisador e assim finalizar a reação.

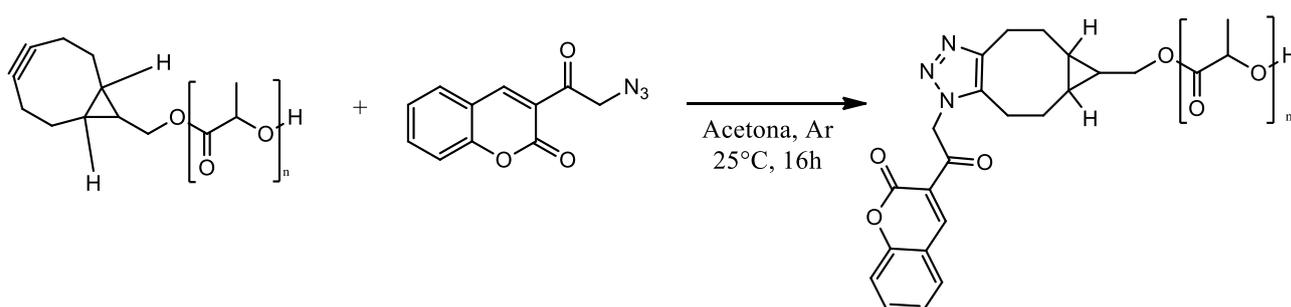
O diclorometano foi removido por rotaevaporação a pressão reduzida. Para purificação o polímero foi redissolvido em 1,5 mL de diclorometano e precipitado em 15 mL de isopropanol e o solvente residual foi removido sob alto vácuo.

5.3. Avaliação da reatividade do grupamento alcino cíclico presente no BCN-PLA

Para avaliar a reatividade do grupamento alcino cíclico presente na cadeia de BCN-PLA foi realizada uma reação de cicloadição azida-alcino utilizando a 3-(α -azidoacetil)-cumarina (azidocumarina, N_3 Cumarina) como molécula fluorescente modelo, conforme procedimento adaptado de Pound-Lana e colaboradores (2017) (Fig. 11).

O BCN-PLA (10,0 mg) foi adicionado a um balão de fundo redondo, equipado com uma barra magnética, e solubilizados em acetona (2,0 mL). A azidocumarina (2 eq. em relação ao alcino) foi adicionada junto ao polímero. O balão foi vedado com septo de borracha, degaseificado com fluxo de argônio e a reação foi mantida sob agitação magnética em atmosfera de argônio, por 16 h a 25°C. Após o tempo de reação, o solvente foi removido em rotaevaporador.

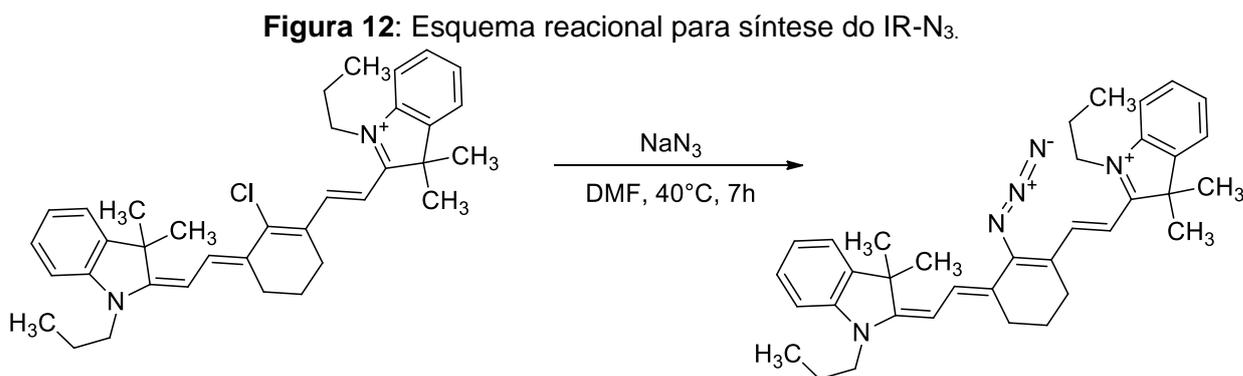
Figura 11: Esquema reacional para a conjugação da 3-(α -azidoacetil)-cumarina ao BCN-PLA via reação de cicloadição azida-alcino.



A avaliação da incorporação da N_3C na cadeia polimérica foi realizada por cromatografia de permeação em gel, conforme metodologia descrita no item 5.8.1., sendo a detecção no ultravioleta realizada utilizando o comprimento de onda de 345 nm (comprimento de onda de máxima absorção da N_3 Cumarina em THF).

5.5. Síntese de IR-N₃

A tentativa inicial de inserção do grupamento azida ao marcador IR780 foi realizada conforme procedimento descrito por Yu e colaboradores (2012) e esquematizado na figura 12.



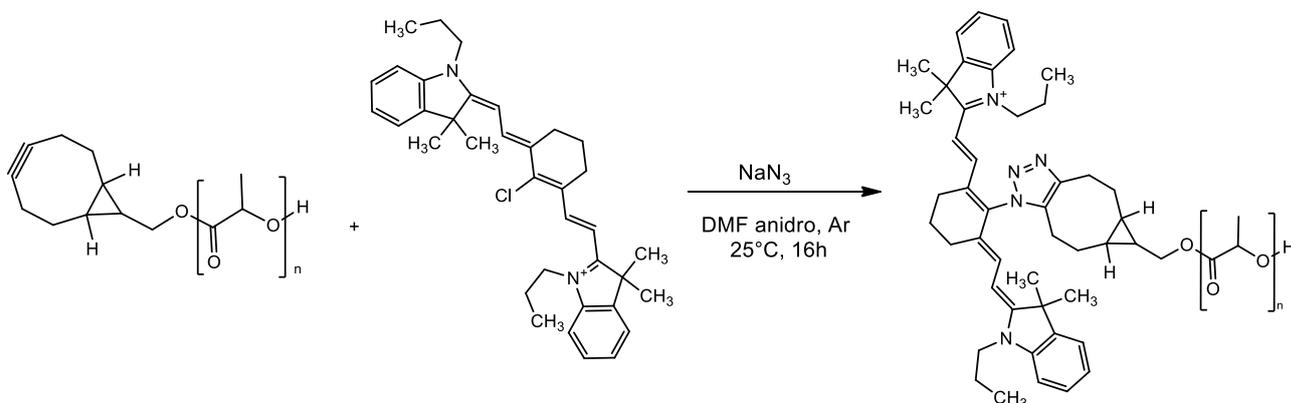
IR780 (0,34 mg; $5,1 \times 10^{-7}$ mol) e azida de sódio (0,33 mg; $5,1 \times 10^{-6}$ mol) foram adicionados em um frasco de vidro âmbar e solubilizados em DMF anidro (1 mL). A solução foi desgaseificada com um fluxo de argônio e mantida sob agitação magnética por 7h com aquecimento em banho-maria a 40°C, ao abrigo da luz e em atmosfera de argônio.

Após o término da reação, o solvente foi removido sob vácuo, o produto obtido foi solubilizado em acetato de etila e filtrado em coluna de sílica gel. O produto obtido foi analisado em um espectrofotômetro de UV-VIS-NIR, sendo a varredura realizada entre 350 e 1100 nm.

5.6. Conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo

O marcador fluorescente IR780 foi conjugado ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC) (Fig. 13). Nessa reação o IR780 é convertido em azida orgânica na presença do PLA com alcino cíclico, sendo este o substrato da segunda etapa reacional.

Figura 13: Esquema reacional para conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino sem catalisador.



BCN-PLA (50 mg), IR780 (0.5 eq. em relação ao alcino) e azida de sódio (10 eq. em relação ao IR780) foram adicionados em um frasco de vidro âmbar tipo frasco de penicilina, equipado com uma barra magnética, e solubilizados em DMF anidro (5 mL). O frasco foi vedado com uma tampa de borracha e lacrado com lacre de alumínio. A solução foi desgaseificada com argônio e mantida sob agitação magnética por 16h, a 25°C, ao abrigo da luz e em atmosfera de argônio.

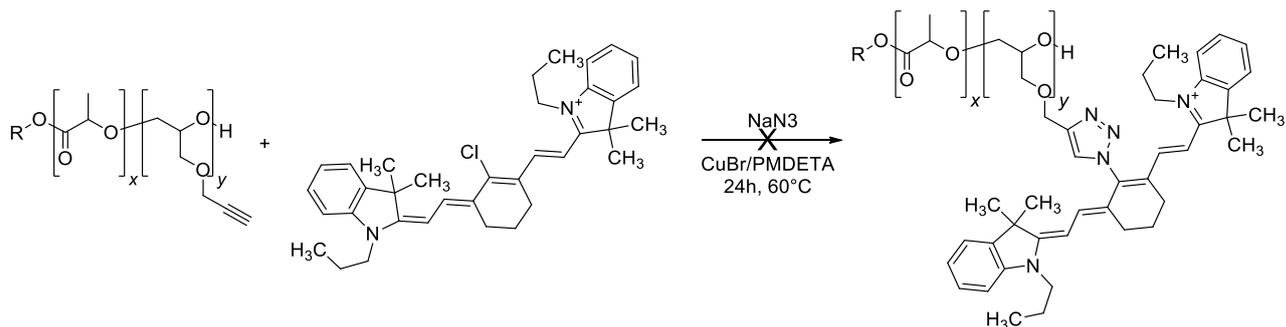
Após o tempo de reação, o solvente foi removido sob alto vácuo. O produto obtido foi solubilizado em acetato de etila e centrifugado por 5 min a 1000 rpm para a remoção dos sais presentes (azida de sódio, cloreto de sódio e iodeto de sódio). O sobrenadante foi recolhido e o solvente foi evaporado sob alto vácuo.

O produto obtido foi solubilizado em acetonitrila e analisado por espectrofotometria de UV-VIS-NIR e a confirmação do sucesso da reação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme procedimento descrito no item 5.8.2.

5.7. Conjugação do IR780 a P(LA-co-PGE) via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre

A tentativa de conjugação do IR780 ao P(LA-co-PGE) foi realizada via uma reação multicomponente de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre, conforme procedimento adaptado de Pound-Lana e colaboradores (2017) (Fig. 14).

Figura 14: Esquema reacional para conjugação do IR780 ao P(LA-co-PGE).



Em um balão Schlenk, equipado com uma barra magnética, foram adicionados P(LA-co-PGE) (20 mg; $2,1 \times 10^{-6}$ mol de PGE), IR780 (4,16 mg; 6×10^{-6} mol) e azida de sódio (4,04 mg; 6×10^{-5} mol). O balão foi vedado com um septo de borracha e foram aplicados cinco ciclos de vácuo/argônio. Foram adicionados, com o auxílio de uma microseringa, o brometo de cobre ($0,45$ mg; 3×10^{-6} mol) e o PMDETA ($0,64$ μ L; 3×10^{-6} mol). Os componentes foram solubilizados em DMF anidro (2 mL) e a reação foi mantida sob agitação magnética por 24h com aquecimento em banho de óleo á 60°C e em atmosfera de argônio.

Após o término da reação o solvente foi removido em rotaevaporador. O produto obtido foi solubilizado em diclorometano e filtrado em sílica gel. Posteriormente, o solvente foi removido em rotaevaporador e produto obtido foi analisado por espectrofotometria no UV-VIS-NIR.

5.8. Caracterização dos polímeros

5.8.1. Cromatografia de permeação em gel

A massa molar média numérica (\bar{M}_n) dos polímeros e sua dispersidade foram determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC) em um cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity acoplado a um detector UV Agilent 1260 Infinity (G1314F) e um detector de índice de refração diferencial (G1362A RID a 35°C) em série, utilizando uma pré-coluna Varian PL gel 5 μ m MiniMix-D 50 \times 4,6 mm e duas colunas Agilent PL gel 5 μ m MiniMix-D 250 \times 4,6 mm em série mantidas a 30°C .

Foi utilizado tetraidrofurano (THF) de grau HPLC estabilizado com 250 ppm de BHT como eluente, a um fluxo de 0,25 mL/min. A detecção no ultravioleta foi realizada utilizando o comprimento de onda de 345 nm.

As amostras foram diluídas em proporção adequada no eluente, de modo a se obter uma concentração final de polímero de 3 mg/mL, filtradas em um filtro de 0,22 µm (PVDF Millipore®) e o volume de injeção foi de 20 µL.

O sistema foi calibrado em termos de relação entre tempo de retenção e massa molar do polímero utilizando padrões de poliestireno de dispersão estreita Agilent Technologies EasiVial (162-371.100 g/mol) e os resultados foram analisados utilizando o Agilent GPC/SEC Software.

5.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

Para verificar o sucesso da reação de conjugação do marcador IR780 ao BCN-PLA, os polímeros foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em um cromatógrafo Waters e2695 acoplado a um detector de UV-VIS Waters 2489. O método utilizado foi desenvolvido e validado por Machado e colaboradores (em andamento não publicado)(MACHADO, [s.d.]) (MACHADO, [s.d.]) (MACHADO, [s.d.]).

A separação foi realizada em uma coluna C18 Gemini - NX Phenomenex® (150 × 4,6 mm, 5µm), acoplada a uma pré-coluna C18 Gemini Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges AJO-7597 4 mm × 3 mm, 3 µm, mantida a uma temperatura de 30°C. Foi utilizada uma fase móvel em gradiente, a um fluxo de 1 mL/min, composta por acetonitrila: água (65:35 v/v) acidificada com ácido acético glacial PA 0,1% (Fase móvel A) e acetonitrila 100% (Fase móvel B). O gradiente utilizado está apresentado na tabela 1.

As amostras foram preparadas em acetonitrila, a uma concentração de polímero na faixa de 0,2 a 1,2 mg/mL de polímero. O volume de injeção utilizado foi de 40 µL e a detecção foi realizada em 700 nm (comprimento de onda máximo disponível no detector UV-VIS). O tempo de corrida utilizado foi 13 min, garantindo a eluição completa da amostra e estabilização do gradiente entre as amostras. O processamento de dados foi realizado no software Empower 2 (Waters Inc.).

Tabela 1: Gradiente de fase móvel utilizado para separação do marcador IR780 livre e conjugado ao PLA.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
	Acetonitrila: água (65:35 v/v) acidificada com ácido acético glacial PA 0,1%	Acetonitrila (100%)
0	100	0
4	100	0
6	10	90
9	10	90
10	100	0
13	100	0

5.8.3. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises de RMN ^1H foram realizadas em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Ascend™ 400 MHz utilizando uma sonda RT-DR-BF/1H-5mm-OZ SP. As amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) numa concentração na faixa de 25 a 70 mg/mL. O espectro foi adquirido a 25°C, foram acumulados 128 transientes e os resultados foram processados utilizando o *software* TopSpin 3.5. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) relativo à referência do tetrametilsilano (TMS) (0 ppm).

5.9. Preparo e caracterização de nanopartículas contendo IR780

As nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) contendo IR780 encapsulado fisicamente ou na forma de conjugado ao PLA (ligação química covalente) (IR-PLA) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (FESSI et al., 1989) e as metodologias específicas de preparo para cada partícula estão descritas a seguir.

5.9.1. Nanoesferas

Foram preparadas duas formulações de nanoesferas (NS): uma NS contendo o IR780 encapsulado (NS PEG-PLA + IR780) e uma NS contendo o IR780 conjugado ao PLA_{4k} (NS PEG-PLA + IR-PLA_{4k}), conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Relação dos constituintes e suas quantidades necessárias para o preparo de nanoesferas contendo o IR780 encapsulado e conjugado ao PLA.

Formulação	IR-PLA_{4k}	PLA_{8k}	PEG_{5k}-PLA_{20k}	IR780
NS PEG-PLA + IR780	0 mg	10 mg	10 mg	140 µg
NS PEG-PLA + IR-PLA	4 mg	6 mg	10 mg	0 mg

Os polímeros (20 mg) foram dissolvidos em acetona (2 mL). A solução do polímero foi vertida lentamente, com o auxílio de uma seringa, em água ultrapura (4 mL), sob agitação magnética a 25°C. A agitação magnética foi mantida por 10 min. A acetona e parte da água foram evaporadas à pressão reduzida utilizando-se um rotaevaporador até um volume final de 2 mL, obtendo-se assim uma suspensão de nanoesferas a uma concentração de 10 mg de polímero por mL.

Para o preparo da NS contendo o IR780 encapsulado (NS PEG-PLA + IR780), o volume adequado de uma solução estoque recém-preparada do marcador em etanol foi adicionado junto a solução de polímero. As demais etapas foram realizadas conforme descrito.

As nanoesferas foram preparadas utilizando uma proporção de PEG-PLA e PLA de 50:50, o que corresponde a aproximadamente 10% de PEG, em massa.

5.9.2. Nanocápsulas

Foram preparadas três formulações de nanocápsulas (NC) contendo o IR-PLA associado a poliésteres biodegradáveis comumente usados para o preparo de nanocarreadores e com diferentes graus de hidrofobicidade (PCL, PLGA 50 e PEG-PLA).

O poliéster (24 mg), IR-PLA (5 mg), Lipoid® S75 (30 mg) e Miglyol® 810N (100 µL) foram solubilizados em acetona (8 mL) sob aquecimento a 40°C e agitação magnética. A solução foi vertida lentamente, com o auxílio de uma seringa, em água ultrapura (16 mL) contendo Pluronic® F68, sob agitação magnética a temperatura ambiente, com exceção da formulação que continha o PEG-PLA, para a qual foi utilizada apenas água ultrapura, sem adição de Pluronic® F68. A agitação magnética foi mantida durante 10 min. A acetona e parte da água foram evaporadas à pressão reduzida utilizando-se um rotaevaporador até um volume final de 4 mL, obtendo-se

assim uma suspensão de nanocápsulas a uma concentração de 7,25 mg de polímero por mL.

5.10. Caracterização das nanopartículas

5.10.1. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das partículas e o seu índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*), utilizando um ângulo de 173° (retroespalhamento). A carga superficial (potencial Zeta - ζ) foi determinada através da mobilidade eletroforética acoplada ao DLS. Ambas as análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, modelo Zetasizer Nano series).

As amostras foram diluídas em proporção adequada (geralmente 1:500 para as NC e 1:50 para as NS) em solução aquosa de NaCl 1mM e as análises foram realizadas a 25°C. Cada amostra foi analisada três vezes pelo próprio equipamento, sendo que para a determinação de tamanho cada análise possuiu de 12-17 corridas e para a determinação de potencial zeta foi estabelecido de um número de corridas igual a 50. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (DV).

5.10.2. Análise da fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência na região do infravermelho foram adquiridos em uma configuração modular compreendendo um laser pulsado de Tsunami (Spectra Physics) a 780 nm com largura de banda de 6 nm, potência de laser de 190 mW, duração de pulso de 80 fs e filtro de corte de 780 nm para suprimir a contribuição da dispersão de luz incidente. Os dados brutos foram suavizados com uma média adjacente de dez pontos no *software* OriginPro-9. Uma amostra de IR780 livre ou IR-PLA na forma nanoestruturada foi diluída em acetonitrila ou água, transferida para uma cubeta de quartzo de comprimento óptico de 10 mm e registrado o espectro de emissão de fluorescência.

Espectrofluorímetros comuns, como os disponíveis na Universidade Federal de Ouro Preto, possibilitam a aquisição de espectros de emissão apenas até o comprimento de onda de 750 nm. Como o marcador IR780 apresenta comprimentos

de onda de máxima absorção e emissão superiores ao limite dos equipamentos disponíveis, as análises foram realizadas na Universidade de Stellenbosch (África do Sul).

5.11. Análise por fracionamento por campo de fluxo assimétrico (AF4)

O fracionamento das suspensões de nanopartículas foi realizado em equipamento de fracionamento por campo de fluxo assimétrico (AF4) acoplado a detectores de UV (254 nm), espalhamento estático da luz (MALS) e fluorescência (FLD) (Postnova Analytics AF2000 MT) de acordo com a metodologia adaptada de POUND-LANA et al. (2017).

As amostras foram previamente diluídas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C durante toda a análise, assim como o amostrador, canal de separação e detectores. O tempo de eluição foi de 60 min, divididos em: 5 minutos de injeção (sendo 3 min o tempo de transição), 10 min para o decaimento exponencial do fluxo cruzado de 1,5 mL/min para 0,05 mL/min, 30 min de fluxo cruzado constante em 0,05 mL/min e 15 min de fluxo cruzado nulo, garantindo assim a eluição total das nanopartículas. As distribuições de valores de diâmetro de giração (por MALS) foram determinadas em fluxo usando o sinal do detector de UV (254 nm) como valor de concentração (relativa entre as frações), respectivamente, como descrito em POUND-LANA e colaboradores (2017). Os comprimentos de onda de excitação e emissão estão descritos junto aos respectivos resultados.

6. RESULTADOS

6.1. Síntese e caracterização de polilactídeo com grupamento alcino

Foram obtidos diversos polímeros derivados do PLA de diferentes massas molares, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3: Polímeros obtidos e suas principais características

Código do polímero ^a	Razão molar iniciador:lactídeo	\bar{M}_n alvo (g/mol)	\bar{M}_n exp (g/mol) ^b	\bar{D} ^b	Conversão (%) ^c
<i>Catalisador: Sn(Oct)₂</i>					
PLA _{9k}	1:55	8.000	8.800	1,37	98
<i>Catalisador: TBD</i>					
-			3.300	1,22	-
-			4.000	1,43	-
PLA _{6k}	1:55	8.000	6.000	1,30	76
PLA _{20k}			20.000	1,50	90
-			5.000	1,15	-
PLA _{8k}			8.000	1,11	65
PLA _{4k}	1:27	4.000	4.000	1,26	46

A razão molar entre o iniciador e o catalisador utilizada foi de 1:1 para todas as polimerizações;

^aCódigo utilizado para os experimentos seguintes

^bDeterminado por GPC

^cCalculada como a razão entre a massa de polímero obtida e a massa de polímero esperada.

\bar{M}_n alvo é a massa molar média numérica esperada baseada na proporção inicial de iniciador em relação ao monômero, considerando uma unidade de iniciador por cadeia e 100% de conversão do monômero;

\bar{M}_n exp Massa molar média numérica determinada experimentalmente (GPC);

\bar{D} Dispersidade da distribuição de massas molares, calculada como a razão \bar{M}_w / \bar{M}_n obtidas por GPC.

A polimerização catalisada pelo Sn(Oct)₂ foi mantida por 15 min, sendo que após 6 min de reação o meio reacional já apresentava uma alta viscosidade, indicativa da conversão do monômero em polímero. Essa polimerização apresentou uma alta porcentagem de conversão (98%). O polímero obtido por essa reação (PLA_{9k}) apresentou uma massa molar próxima ao desejado e distribuição uniforme de tamanho ($\bar{D} < 1,5$), indicando um controle do processo de polimerização, necessário para a obtenção de polímero de massa molar e estrutura química predeterminadas. Sendo assim, foi realizada apenas uma polimerização utilizando esse catalisador.

Em relação à polimerização catalisada pelo TBD, foi necessária a realização de várias reações até a obtenção de polímeros que apresentassem a massa molar desejada.

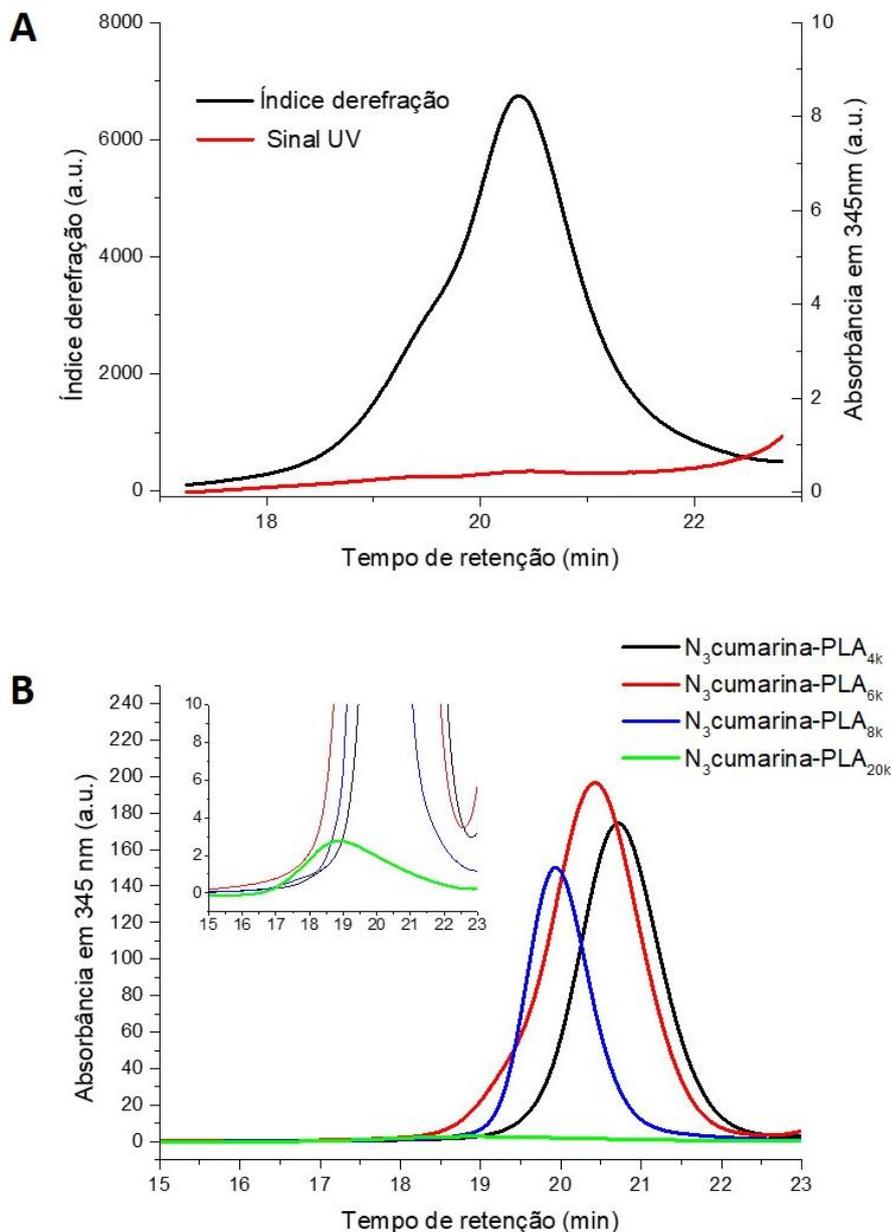
No geral, os polímeros obtidos por reação catalisada pelo TBD apresentaram valores de massas molares e dispersidade variados. As porcentagens de conversão dos polímeros variaram de 46 a 90%. O polímero PLA_{20k} apresentou massa molar superior à esperada, além de um alto valor de \bar{D} , quando comparado aos demais, indicando uma distribuição de massas molares não uniforme. Os polímeros PLA_{8k} e PLA_{4k} apresentaram uma massa molar próxima ao desejado, com distribuição de tamanho homogênea (baixo valor de \bar{D}).

6.2. Avaliação da reatividade do grupamento alcino cíclico presente no BCN-PLA

A técnica de GPC fornece uma separação dos analitos em função do diâmetro hidrodinâmico (D_h). Desse modo moléculas com maior D_h apresentam um menor tempo de retenção. Por essa técnica são determinadas as massas molares relativas, a partir de uma curva de calibração construída utilizando padrões poliméricos de massa molar conhecida. Os padrões mais difundidos são os de poliestireno solubilizados em THF, como foi usado nesse estudo. Além disso, a técnica de GPC foi utilizada para a obtenção de informações sobre a reatividade química do polímero. Para avaliar a reatividade do grupo alcino cíclico (ciclooctila) a azidas orgânicas foi realizada uma derivatização deste grupo utilizando uma molécula modelo, a 3-(α -azidoacetil)-cumarina. Essa molécula possui o grupo azida para ligação à ciclooctila do BCN-PLA e máximo de absorção característico em 345 nm. Quando analisada por GPC, a azidocumarina apresentou tempo de retenção superior à 22 min (dado não apresentado). O BCN-PLA não apresenta absorção em 345 nm, assim a detecção por UV neste comprimento de onda associada a tempos de retenção curtos confirma a ligação covalente da cumarina ao polímero.

Análise por GPC do PLA_{9k} após reação de cicloadição azida-alcino com a N₃Cumarina demonstrou ausência de absorção em 345 nm, indicando que a reação de conjugação com o marcador não foi bem-sucedida (Fig. 15A).

Figura 15: Cromatogramas obtidos por GPC dos polímeros após a reação de cicloadição azida-alcino com a azidocumarina



(A) Cromatograma para o PLA_{9k}. Em preto observa-se o sinal de índice de refração e em vermelho o sinal de absorção no UV (345 nm). **(B)** Cromatogramas para PLA_{4k}, PLA_{6k}, PLA_{8k} e PLA_{20k}. No *insert* observa-se um aumento do cromatograma, sendo possível identificar um pequeno sinal de absorção para o N_3 cumarina-PLA_{20k}.

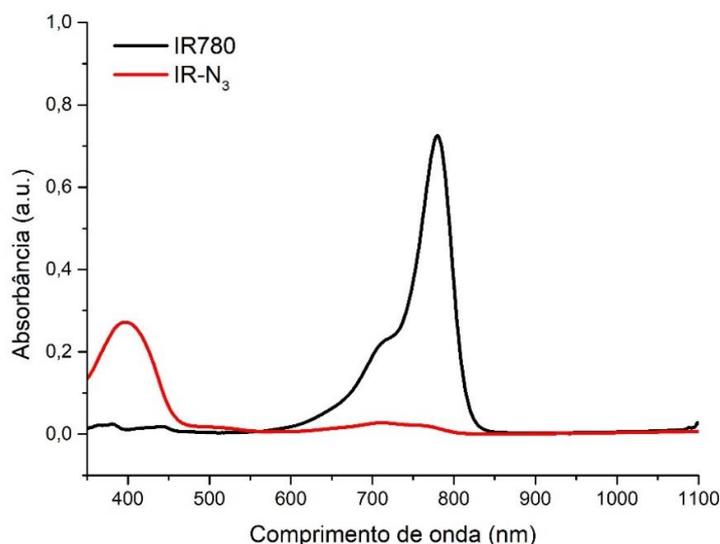
Dentre os polímeros obtidos por reação catalisada pelo TBD, os PLA_{4k}, PLA_{6k}, PLA_{8k} e PLA_{20k}, foram selecionados para avaliação da reatividade do grupamento ciclooctila através da reação de conjugação com a azidocumarina.

Análise por GPC demonstrou que, após a reação de cicloadição azida-alcino (AAC) com a azidocumarina, os polímeros PLA_{4k}, PLA_{6k} e PLA_{8k} apresentaram absorção intensa em 345 nm, confirmando a formação da ligação covalente entre a azidocumarina e o polímero, ao longo da distribuição de massas molares (Fig. 15B). O PLA_{20k} apresentou apenas uma fraca absorção em 345 nm.

6.3. Síntese de IR-N₃

Após a reação de síntese do IR-N₃ o produto obtido foi analisado por espectrofotometria no UV-VIS-NIR. O espectro de varredura obtido (Fig.16) apresentou apenas uma banda de absorção centrada em 397 nm, com ausência do pico de absorção característico do marcador IR780 em 780 nm, indicando que o mesmo foi consumido e eventualmente degradado durante a reação.

Figura 16: Espectros de absorção do marcador fluorescente IR780 e do produto obtido após reação com azida de sódio, em acetonitrila.



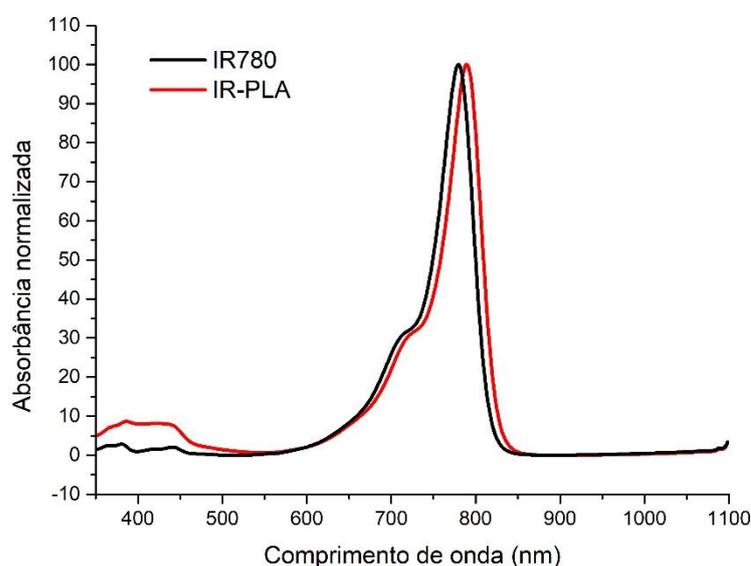
Em preto observa-se o espectro de absorção do IR780, analisado em acetonitrila a uma concentração de 1,4 µg/mL, e em vermelho o espectro de absorção do IR780 após reação com azida de sódio (IR-N₃), analisado em acetonitrila a uma concentração de 6,84 µg/mL.

6.4. Conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo (SPAAC)

Foram utilizados os polímeros PLA_{4k}, PLA_{8k} e PLA_{20k} para a realização das reações de conjugação do marcador IR780 a PLA contendo grupo alcino cíclico ativado.

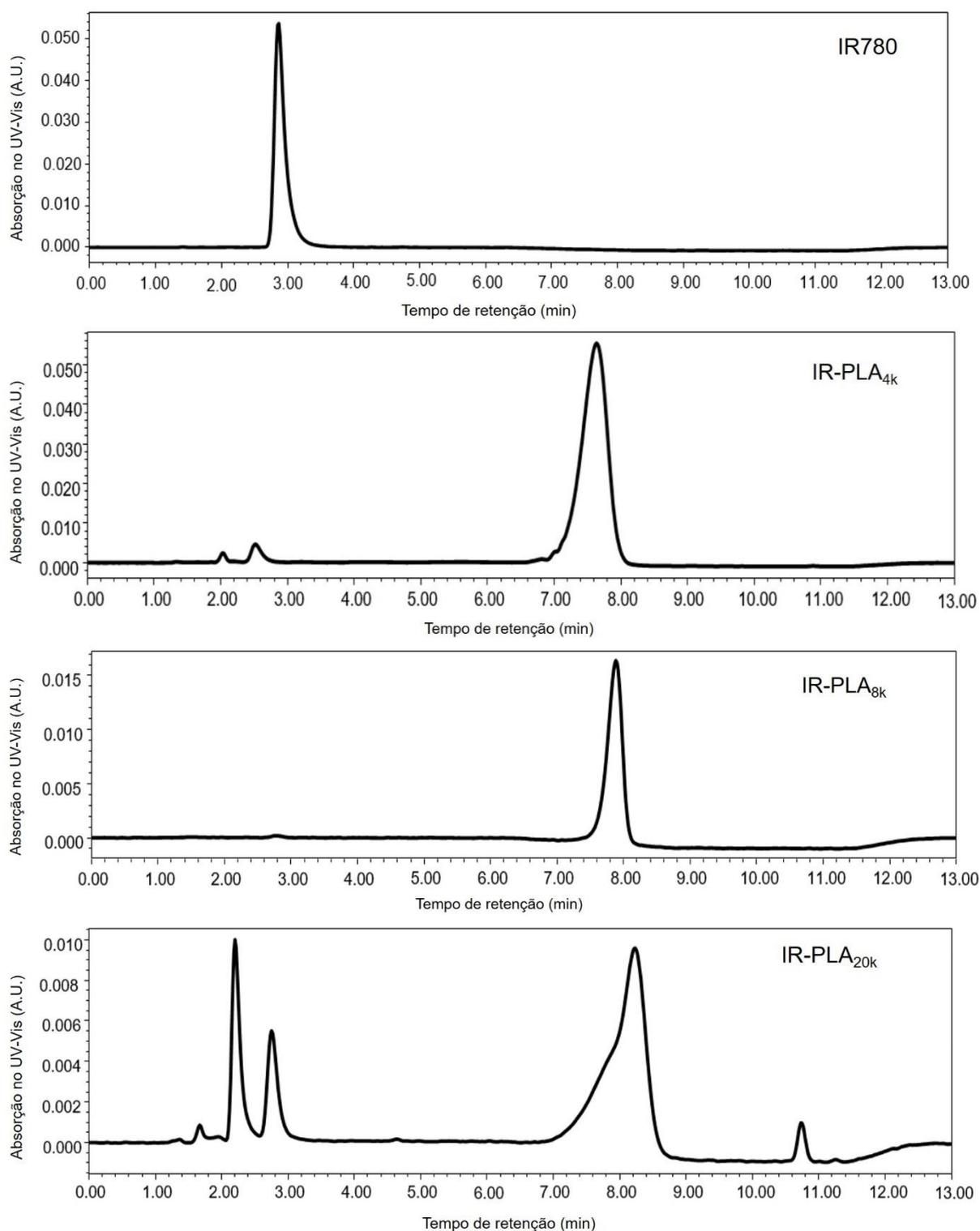
Após as reações de conjugação, os produtos obtidos foram diluídos em acetonitrila e analisados por espectrofotometria no UV-VIS-NIR. Os espectros de varredura do produto obtido, em todas as reações, apresentaram uma banda de absorção intensa com comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) igual a 789 nm, o que representa um deslocamento batocrômico de 9 nm em relação ao $\lambda_{\text{máx}}$ do IR780 precursor da reação. Esse deslocamento pode ser decorrente da presença dos grupamentos triazol e carbonila presentes no IR-PLA. Os espectros do IR780 livre e conjugado ao PLA_{4k} podem ser observados na figura 17.

Figura 17: Espectros de absorção no UV-VIS-NIR para o IR780 livre e IR-PLA_{4k}



Após a análise por espectrofotometria no UV-VIS-NIR, os polímeros foram então analisados por CLAE-UV para confirmação da inserção do marcador IR780 à cadeia polimérica do BCN-PLA. Como este marcador apresenta absorção apenas na região do infravermelho próximo, não foi possível realizar a análise dos polímeros IR-PLA por GPC, uma vez que o detector disponível abrange apenas os comprimentos de onda do ultravioleta.

Figura 18: Cromatogramas obtidos após análise por CLAE-UV do marcador IR780 e dos polímeros conjugados ao IR780 (IR-PLA_{4k}, IR-PLA_{8k} e IR-PLA_{20k}).



A figura 18 apresenta os cromatogramas obtidos após análise do marcador IR780 livre e de cada um dos polímeros (IR-PLA_{4k}, IR-PLA_{8k} e IR-PLA_{20k}). Pode-se observar que o IR780 livre apresentou tempo de retenção próximo a 3 min, enquanto

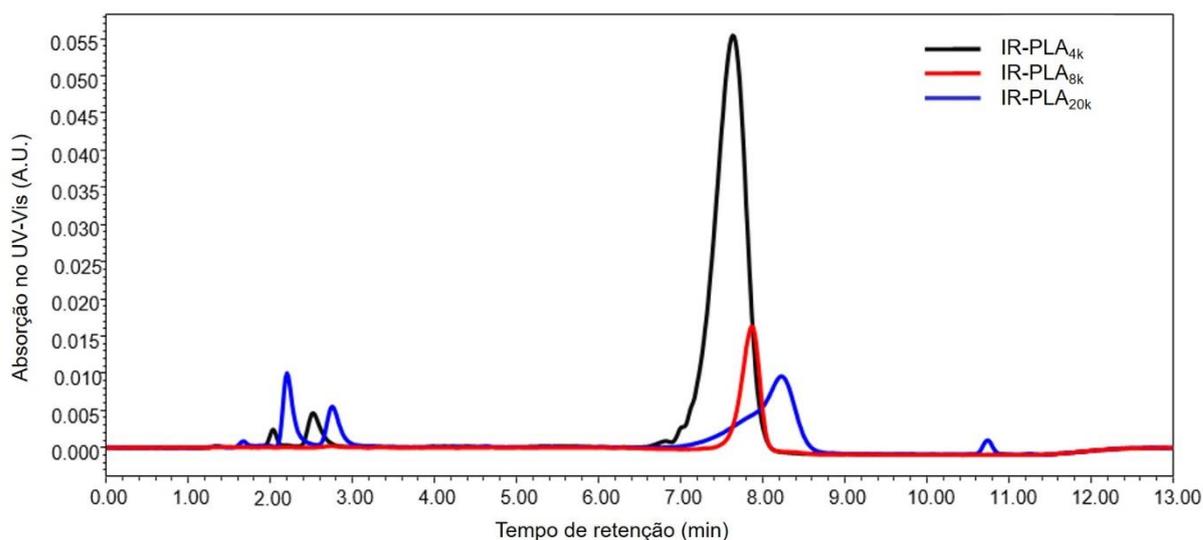
que o IR780 ligado ao PLA apresentou tempo de retenção próximo a 8 min. O tempo de retenção do IR-PLA corresponde a uma composição de fase móvel com teor de acetonitrila superior a 90%, já que o gradiente alcança um teor máximo em acetonitrila de 96%.

O BCN-PLA não possui absorção no comprimento de onda utilizado (700 nm), de modo que seu cromatograma apresenta apenas linha de base (resultado não mostrado).

A presença de pico com tempo de retenção próximo a 8 min indica a formação de ligação covalente entre os polímeros e o marcador. Observa-se que a quantidade de marcador livre (tempo de retenção < 3 min) presente nas amostras de IR-PLA_{4k} e IR-PLA_{8k} é pequena, indicando que as condições reacionais utilizadas foram adequadas para a reação SPAAC.

A comparação entre os três cromatogramas (Fig. 19) mostra que o tempo de retenção variou de acordo com o tamanho da cadeia polimérica, sendo que menores massas molares apresentam menor tempo de retenção. Além disso, observa-se uma maior intensidade do sinal para o polímero de menor \bar{M}_n , demonstrando que polímeros menores apresentam maior capacidade de conjugação.

Figura 19: Comparação entre os cromatogramas dos polímeros conjugados ao IR780, IR-PLA_{4k} (preto), IR-PLA_{8k} (vermelho) e IR-PLA_{20k} (azul).

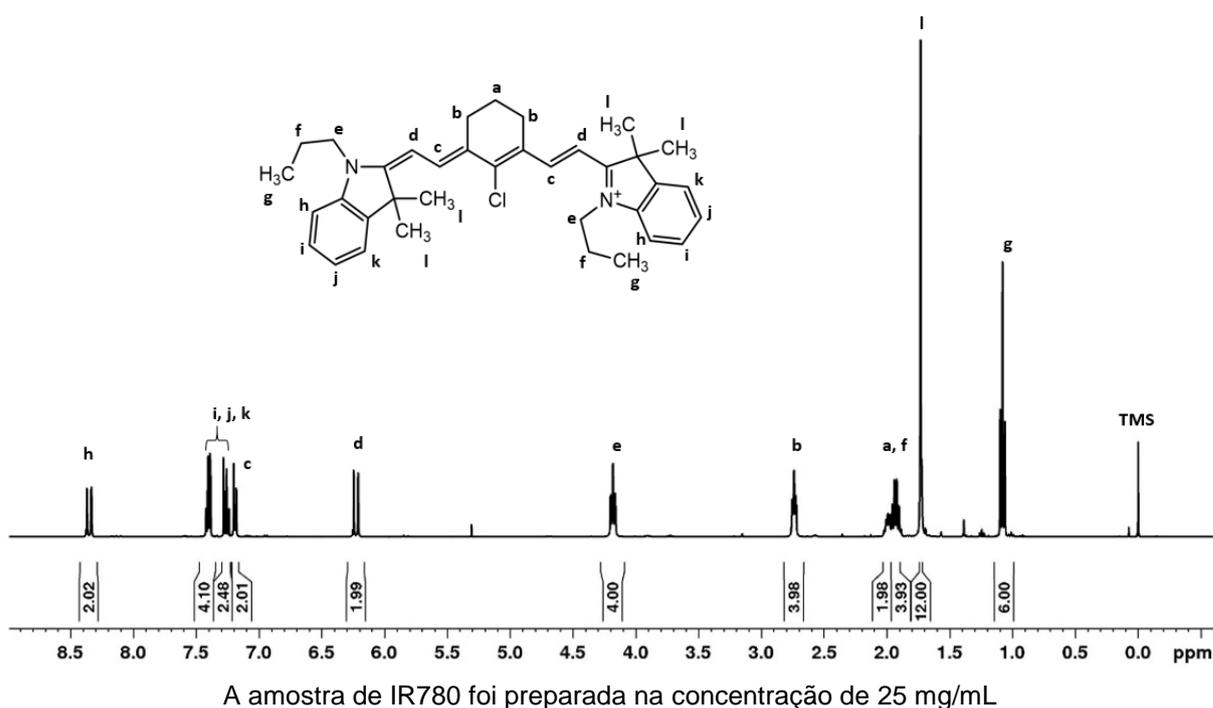


6.5. Ressonância Magnética Nuclear do ^1H

Foram obtidos os espectros de RMN ^1H para o IR780, o BCN-PLA_{8k} e o IR-PLA_{8k} a fim de verificar a composição química do produto da reação.

Para o IR780 (Fig. 20) foram observados os seguintes picos: δ 8,37-8,34 ppm (d, 2H), 7,42-7,39 ppm (m, 4H), 7,28-7,24 ppm (m, 2H), 7,20-7,18 ppm (d, 2H), 6,25-6,21 ppm (d, 2H), 4,20-4,16 ppm (t, 4H), 2,75-2,72 ppm (t, 4H), 2,01-1,98 ppm (m, 2H), 1,96-1,90 ppm (m, 4H), 1,73 (s, 12H), 1,10-1,06 ppm (t, 6H). As integrais foram calibradas utilizando como referência o sinal (e) correspondendo a dois grupamentos metileno por molécula de IR780, sendo atribuído a ele um valor igual a 4. Os dados obtidos confirmam a estrutura do IR780 e estão de acordo com os dados descritos na literatura (PALAO-SUAY et al., 2017; YUAN et al., 2015).

Figura 20: Espectros de ressonância magnética nuclear ^1H para o IR780

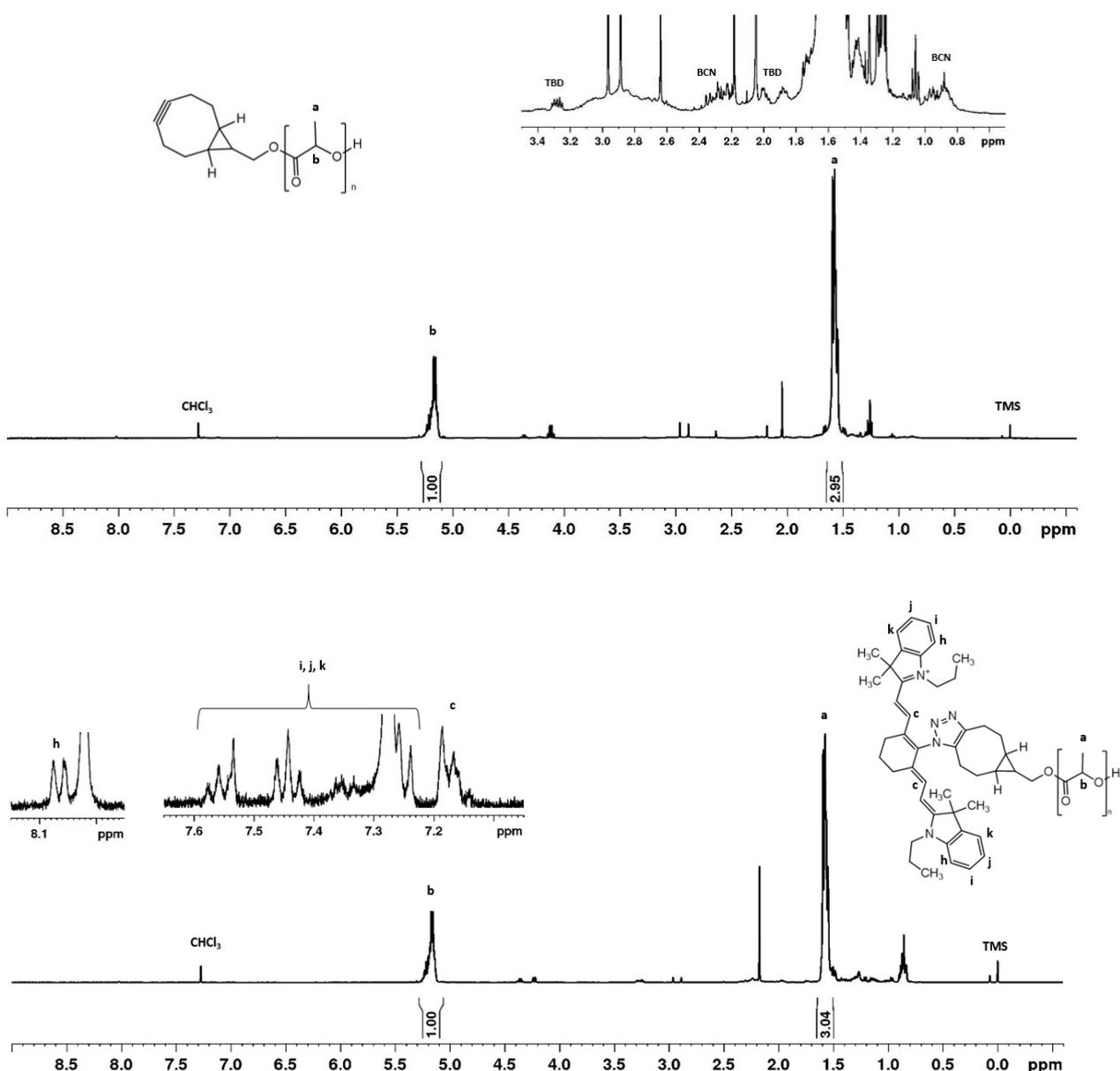


Para o BCN-PLA_{8k} e para o IR-PLA_{8k} (Fig. 21) foi possível identificar os seguintes picos: δ 5,23-5,14 (m, 1H) e 1,59-1,55 (m, 3H), referentes a estrutura química do polilactídeo. As integrais foram calibradas utilizando como referência o próton (b), com valor igual a 1. Observa-se uma relação de, aproximadamente, 1:3 entre os valores de integração dos prótons (b) e (a), como esperado. Sinais referentes

ao BCN podem ser observados em δ 2,37-2,20 ppm (m) e 1,00-0,83 ppm (m) (*insert* na Fig. 23).

No espectro do IR-PLA_{8k} (Fig. 21) é possível observar sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos da molécula do marcador IR780 (δ 8,08-8,06; 7,58-7,24; 7,18-7,17), indicando que, mesmo em baixa concentração, o marcador está presente na amostra.

Figura 21: Espectros de ressonância magnética nuclear ¹H para o BCN-PLA_{8k} e IR-PLA_{8k}.



As amostras foram preparadas nas seguintes concentrações: BCN-PLA_{8k}: 50 mg/mL e IR-PLA_{8k}: 67 mg/mL (concentração estimada de IR de 3 mg/mL).

É possível identificar no espectro do BCN-PLA_{8k} e do IR-PLA_{8k} a presença de picos referentes ao TBD, utilizado como catalisador da reação de polimerização (δ 3,31-3,25 ppm; 2,03-1,95 ppm) e a solventes como clorofórmio residual (s, 7,26 ppm), acetona (s, 2,18 ppm), acetato de etila (s, 2,05; q, 4,12; t, 1,26), dimetilformamida (s, 8,02; s, 2,96; s, 2,88), isopropanol, além de graxa de silicone (s, 0,07).

6.6. Conjugação do IR780 ao P(LA-co-PGE) via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre

O produto da reação do PLA-co-(PGE) com IR780 não apresentou absorção em comprimentos de onda característicos do marcador, quando analisado por espectrofotometria no UV-VIS-NIR, indicando que a reação não foi bem-sucedida. Esse polímero não foi analisado por CLAE/UV-VIS devido à ausência de absorção observada no espectro do visível no modo em batelada.

6.7. Preparo e caracterização de nanopartículas

Foram preparadas cinco formulações de nanopartículas, sendo duas formulações de nanoesferas e três de nanocápsulas. Em relação as NS, foi preparada uma formulação uma contendo o IR780 ligado ao PLA (NS PEG-PLA + IR-PLA) e outra contendo o IR780 encapsulado (NS PEG-PLA + IR780), a fim de comparar o comportamento do marcador NIR ora ligado covalentemente ao polímero, ora aprisionado fisicamente na matriz polimérica (encapsulado). Em relação às NC, foram preparadas formulações contendo o IR-PLA associado aos polímeros PEG-PLA, PCL e PLGA, para avaliar o uso do IR-PLA como marcador polimérico versátil de NP.

As formulações foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta. Os valores obtidos para cada formulação estão apresentados na tabela 5. As nanopartículas apresentaram tamanho reduzido, com diâmetros médios, determinados por DLS, na faixa de 69 e 174 nm e distribuição homogênea de tamanho ($PdI < 0,3$), sendo que as NS apresentaram tamanhos inferiores ao das nanocápsulas. O potencial zeta (ζ) foi negativo de acordo com a presença de grupos polarizáveis do PLA. Embora o marcador tenha carga positiva, a

concentração de moléculas do marcador por polímero é baixa e pode ser facilmente mascarada pelo PEG.

Tabela 4: Caracterização das formulações preparadas em termos de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.

Formulação		D_h (nm) \pm DV	Pdl	ζ (mV) \pm DV
Nanosferas	PEG-PLA + IR-PLA	69,0 \pm 1,3	0,150	-24,2 \pm 3,4
	PEG-PLA + IR780	78,0 \pm 0,6	0,176	-24,2 \pm 3,4
Nanocápsulas	PEG-PLA + IR-PLA	123,5 \pm 1,1	0,164	-38,3 \pm 0,7
	PCL+IR-PLA	168,5 \pm 0,7	0,130	-42,4 \pm 1,2
	PLGA+IR-PLA	173,9 \pm 0,5	0,110	-47,0 \pm 0,7

D_h Diâmetro hidrodinâmico

Pdl Índice de Polidispersão

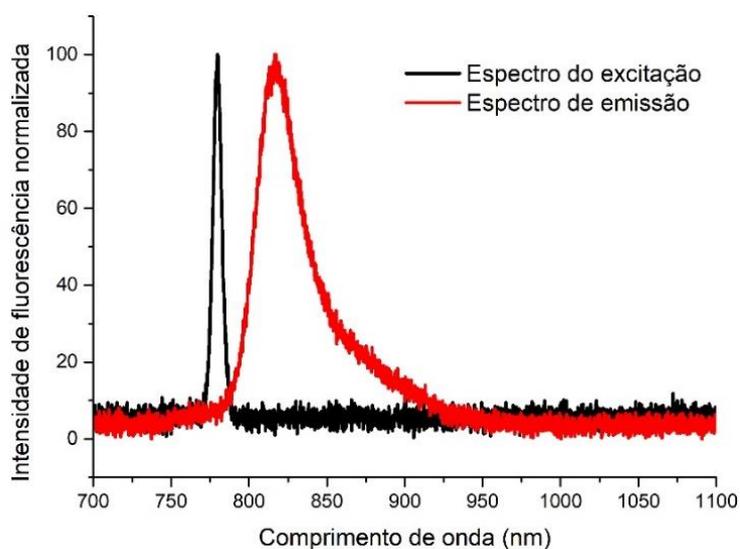
ζ Potencial Zeta

DV desvio padrão das três leituras realizadas pelo equipamento

6.8. Análise das propriedades fotofísicas por espectrofluorimetria

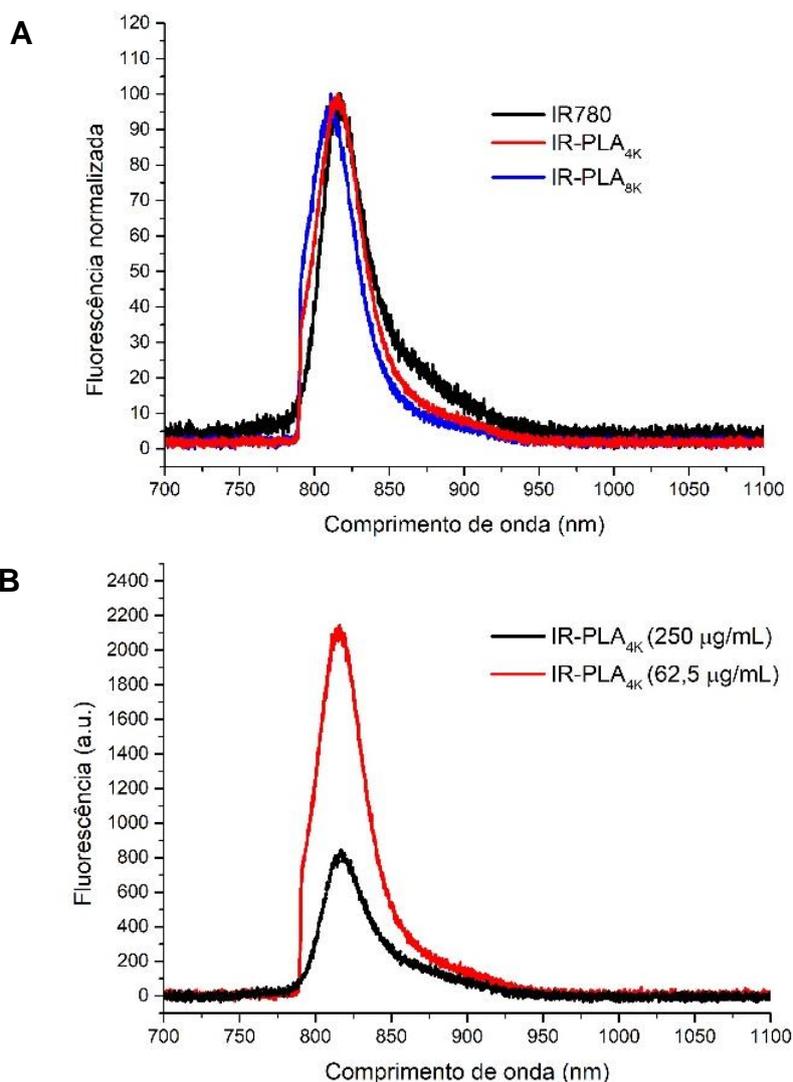
Os espectros de excitação e emissão do marcador IR780 (Fig. 22) foram determinados em acetonitrila, sendo observado um comprimento de onda de máxima excitação (λ_{exc}) igual a 780 nm e um comprimento de onda de máxima emissão (λ_{em}) igual a 817 nm.

Figura 22: Espectros de excitação e emissão do marcador IR780 em acetonitrila.



Os polímeros IR-PLA_{4k} e IR-PLA_{8k} foram analisados, em acetonitrila, e apresentaram fluorescência intensa, com mesmo comprimento de onda de máxima emissão do IR780 ($\lambda_{em} = 817 \text{ nm}$), conforme pode ser observado na figura 23A. Os espectros foram normalizados pois as amostras se encontravam com concentrações diferentes de marcador.

Figura 23: Espectros de emissão de fluorescência do IR780 livre e dos polímeros IR-PLA_{4k} e IR-PLA_{8k}, em acetonitrila.

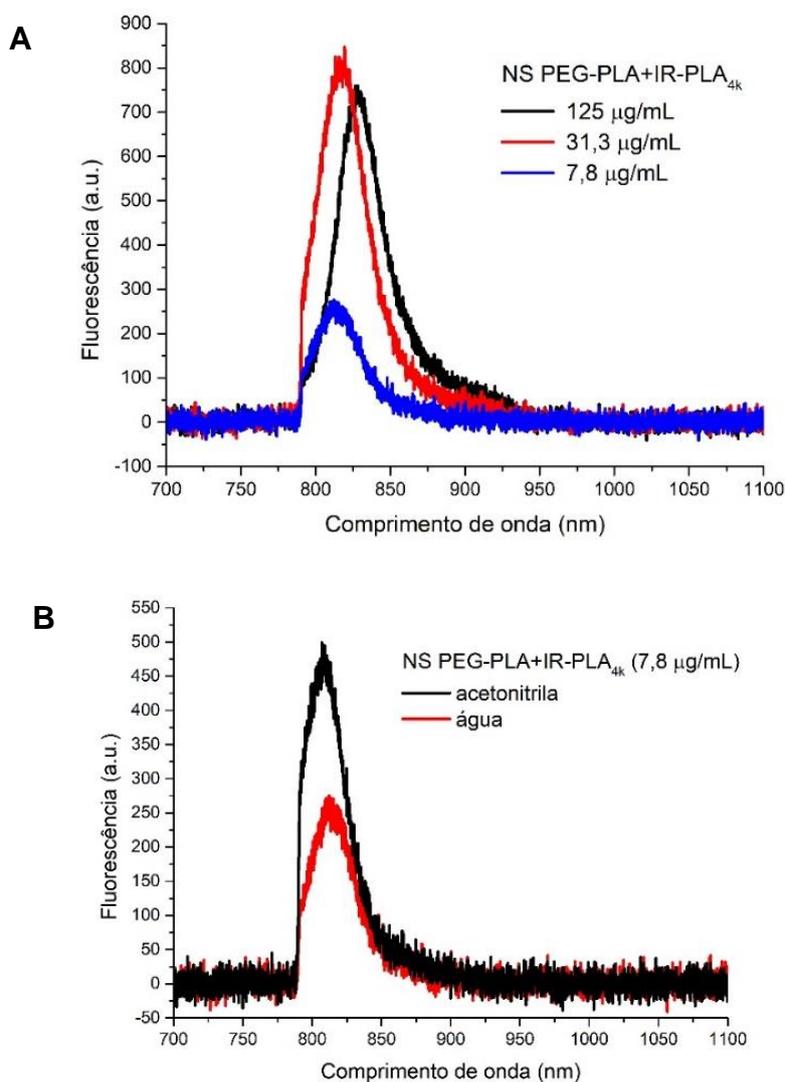


A amostra de IR-PLA_{4k} foi analisada em duas concentrações diferentes. Observa-se que houve uma redução na intensidade da fluorescência com o aumento da concentração de IR-PLA, acompanhado por um deslocamento batocrômico do máximo de emissão, indicando a ocorrência de *quenching* (Fig. 23B). Esse efeito pode

ser explicado pela reabsorção de fótons emitidos quando a concentração em cromóforo é alta. Esse tipo de *quenching* por efeito de filtro interno também foi observado para a formulação de NS contendo IR-PLA_{4k}, analisada em água, conforme apresentado na figura 24.

As NS PEG-PLA+IR-PLA_{4k}, na concentração de 7,8 µg/mL, também foram analisadas em acetonitrila. Observa-se que, para uma mesma concentração de partículas, a amostra preparada em acetonitrila apresentou uma maior intensidade de fluorescência, quando comparada a amostra analisada em água, com perda de aproximadamente 50% da intensidade de fluorescência em meio aquoso (Fig. 24B).

Figura 24: Espectros de fluorescência de nanoesferas contendo IR-PLA_{4k}, em água (A) e em acetonitrila (B).

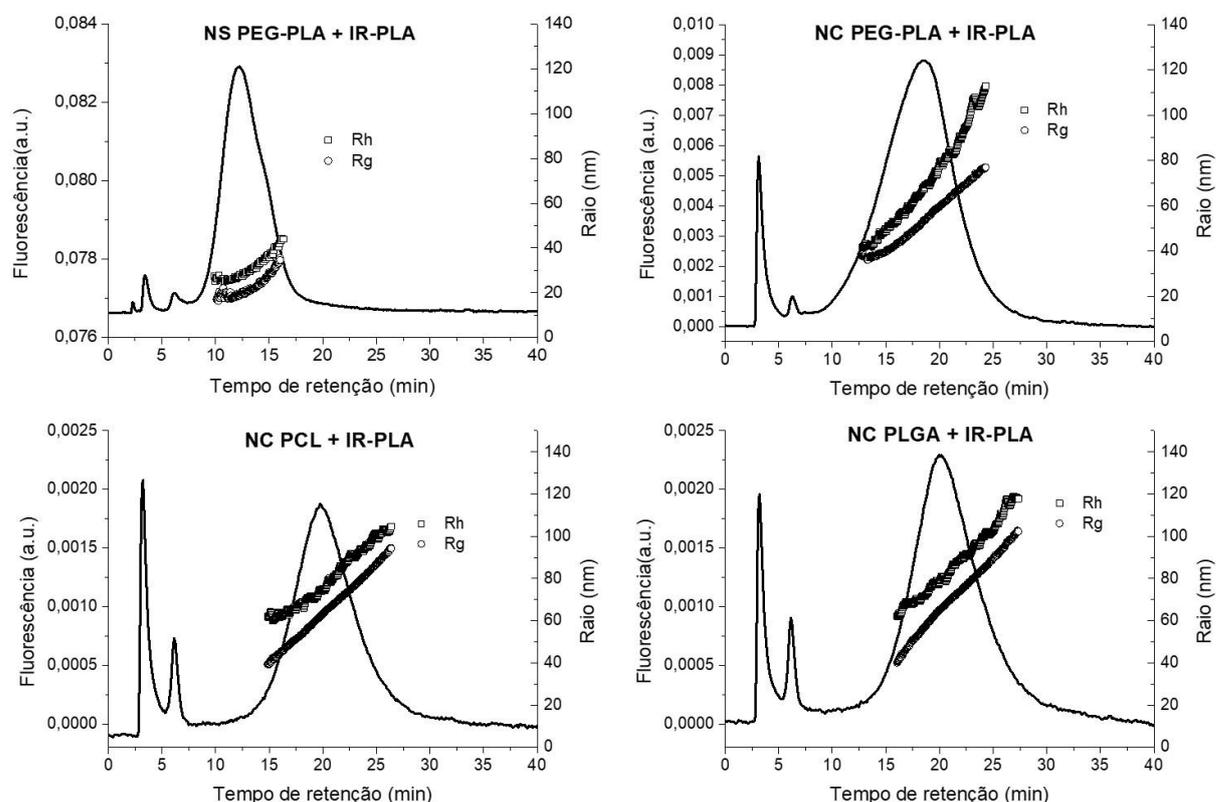


6.9. Análise por AF4-MALS-FLD

As formulações de nanopartículas foram analisadas pela técnica de AF4 associada a detecção por MALS e fluorescência (AF4-MALS-FLD).

Os fractogramas obtidos para as nanopartículas contendo o IR-PLA associado a outros polímeros estão apresentados na figura 25. É possível observar que a separação das frações da amostra de partículas foi satisfatória, observando-se um aumento do tamanho das partículas (raio de giração (R_g) e do raio hidrodinâmico (R_h)) em função do tempo de retenção.

Figura 25: Fractograma das formulações de nanoesfera e nanocápsulas contendo o IR780 conjugado ao PLA associado a diferentes polímeros



Para análise das NS PEG-PLA+IR-PLA foram utilizados os comprimentos de onda de excitação e emissão de 760 e 780 nm, respectivamente. Para as demais partículas os comprimentos de onda utilizados foram 780 nm para excitação e 808 nm para emissão.

R_g Raio de giração, determinado por MALS

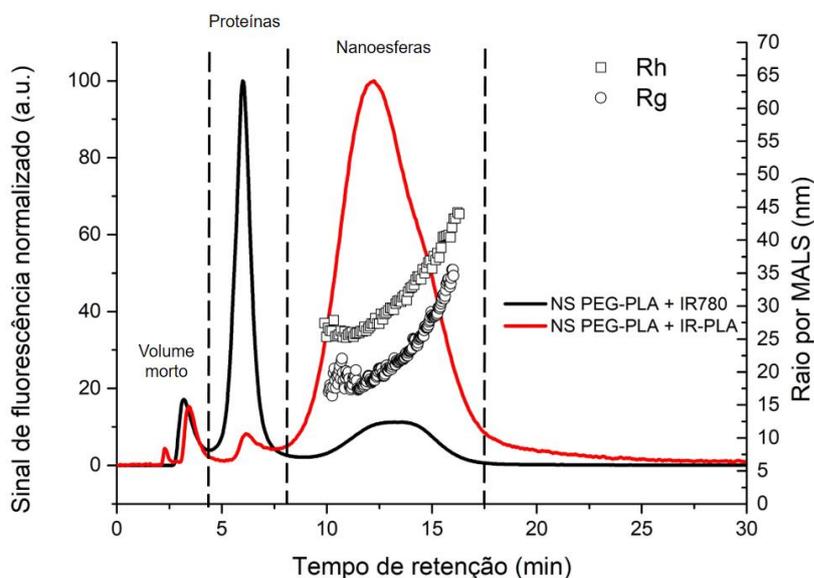
R_h Raio hidrodinâmico, determinado por DLS

As nanopartículas (NS e NC), analisadas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino a uma temperatura de 37°C, apresentaram fluorescência no infravermelho próximo, indicando que o IR-PLA se associou aos demais polímeros

para a formação das partículas e que essas partículas são estáveis em meio de cultivo de células.

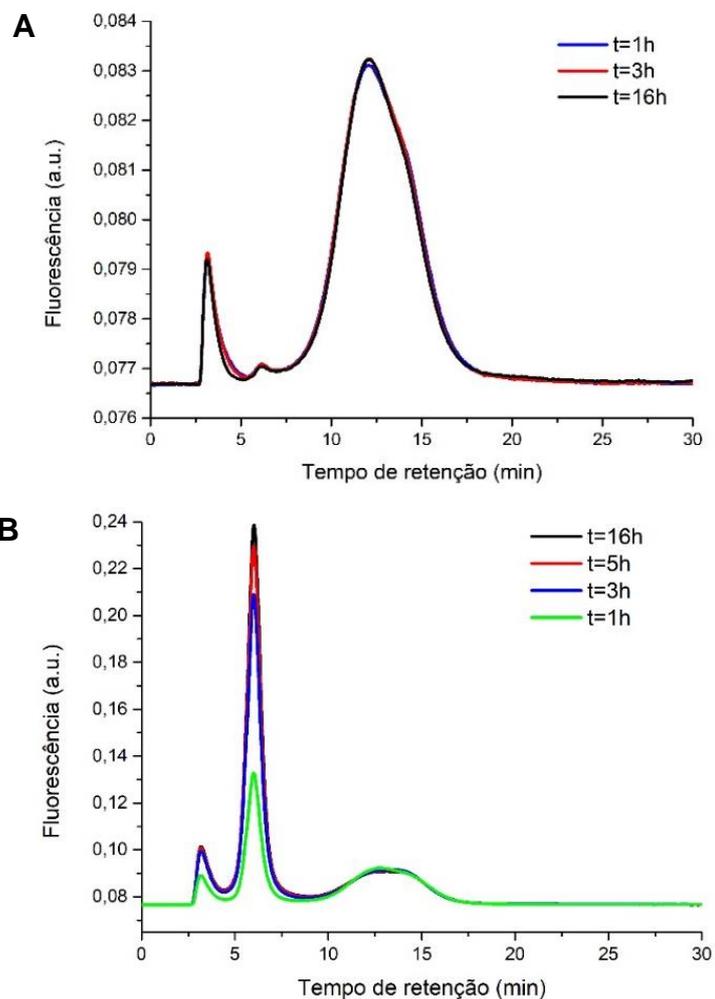
Entretanto, para a NS PEG-PLA+IR780 essa transferência do marcador não foi observada (Fig. 26). Isso corrobora o fato da ligação do IR780 covalentemente ao polímero garantir a estabilidade da marcação fluorescente das nanoesferas.

Figura 26: Fractograma das formulações contendo IR780 encapsulado (preto) e conjugado ao PLA (vermelho).



A fluorescência das NS contendo o IR780 ligado ao polímero e encapsulado se mostrou estável, mesmo após a incubação em meio DMEM contendo 10% de FBS a 37°C, não havendo redução da intensidade de fluorescência ao longo do tempo por 16h (Fig. 27A). Entretanto, observou-se que, para a formulação que contém o IR780 encapsulado, com o tempo há um aumento da fluorescência associada às proteínas séricas (Fig. 27B), indicando que a transferência do marcador para essas proteínas ocorre de maneira progressiva ao longo do tempo. Durante o processo de preparo das nanoesferas, parte do marcador pode se associar à superfície da partícula, o que resulta em uma transferência rápida para as proteínas, após incubação em meio DMEM contendo FBS.

Figura 27: Fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) das formulações contendo IR780 conjugado ao PLA (A) e encapsulado (B), após incubação em DMEM/FBS a 37°C.



7. DISCUSSÃO

7.1. Síntese, caracterização e avaliação da reatividade de polímeros derivados do polilactídeo contendo grupo alcino reativo

O uso do TBD como um potente catalisador de polimerização por abertura de anel de ésteres cíclicos foi descrito por Pratt e colaboradores (2006). Segundo os autores, o TBD atua por um mecanismo bifuncional, sendo capaz de ativar o iniciador e o monômero, o que justifica a sua elevada atividade catalítica, promovendo reações de polimerização em segundos à temperatura ambiente ou mais baixas, com um bom controle da massa molar e dispersidade.

Entretanto, os polímeros obtidos pela reação catalisada pelo TBD apresentaram massas molares e índices de polidispersão variados, provavelmente devido à presença de contaminantes como água. Reações de polimerização por abertura de anel são sensíveis à umidade, uma vez que essas reações são iniciadas por grupamentos hidroxila. A umidade presente no ambiente pode interferir no processo de polimerização devido a desativação do TBD, impedindo a formação do polímero, participando da iniciação de cadeias, interrompendo o crescimento de cadeias ou hidrolisando as cadeias já formadas, resultando em polímeros com baixa \bar{M}_n e maior dispersidade.

Devido às interferências da água no processo de polimerização, associado ao fato do TBD ser uma substância higroscópica e deliquescente, a utilização desse catalisador exige um processo rigoroso de purificação e secagem de todos os reagentes. Além disso, é necessário que as reações sejam realizadas em ambiente com atmosfera inerte.

O PLA_{20k} apresentou massa molar superior à esperada, além de um alto valor de Đ. É possível que a reação de polimerização tenha ocorrido sem que todo o iniciador tivesse sido consumido, gerando cadeias poliméricas longas, além de uma grande variação no tamanho das cadeias.

Os polímeros PLA_{8k} e PLA_{4k} apresentaram massa molar próxima ao desejado, com um baixo valor de Đ. Isso pode ser devido a adoção de um processo de secagem mais rigoroso do catalisador, que apresentou uma forma cristalina após esse processo. Além disso, todos os demais reagentes utilizados nessas polimerizações foram recém-adquiridos, tendo sido abertos no momento da reação.

Pratt e colaboradores (2006) investigando a possibilidade de utilização do TBD como catalisador de polimerização, obtiveram polímeros de L-lactídeo com elevada conversão e baixo valor de \bar{D} . Van Den Berg, Zuilhof e Wennekes (2016) também obtiveram PLA com elevada conversão e baixo \bar{D} utilizando o TBD como catalisador em sistema em fluxo, através do uso de um microrreator. Entretanto, as polimerizações feitas em batelada apresentaram uma baixa conversão. Em ambos os trabalhos, o TBD foi armazenado e manipulado dentro de uma caixa de atmosfera inerte (*glove box*), o que limita a contaminação do catalisador com a água presente no ambiente.

Apesar da grande variação de \bar{M}_n dos PLA obtidos pela polimerização catalisada pelo TBD, a reação de cicloadição azida-alcino com a azidocumarina demonstrou que a reatividade do grupamento ciclooctila foi mantida, uma vez que o marcador foi efetivamente conjugado a cadeia polimérica. Desse modo, os polímeros obtidos por essa via foram utilizados para conjugação do marcador IR780.

Na análise realizada por RMN ^1H para o BCN-PLA_{8k} a relação de, aproximadamente, 1:3 entre os valores de integração dos prótons (b) e (a), corrobora para a confirmação da estrutura do polímero.

Li e colaboradores (2015) sintetizaram a molécula de BCN-OH e a caracterizaram por RMN ^1H . Segundo os autores, o espectro do BCN-OH apresenta picos entre 3,60 e 0,63 ppm. Entretanto, no espectro obtido para o BCN-PLA_{8k} foi possível identificar apenas dois sinais referentes ao BCN. Para o espectro do BCN-PLA_{8k} obtido, há uma alta densidade de sinais na região onde os picos do BCN se localizam, podendo haver uma sobreposição entre eles, o que impede sua identificação.

Foi realizada uma polimerização do lactídeo utilizando como iniciador o BCN-OH e catalisada pelo Sn(Oct)₂. Apesar desse catalisador gerar polímeros com bom controle da massa molar e baixo \bar{D} , seu uso em polimerizações contendo o BCN-OH como iniciador, visando a inserção de um grupamento reativo na cadeia polimérica, não se mostrou adequado. Ao avaliar a reatividade do grupo ciclooctila utilizando a azidocumarina observou-se que não houve a conjugação do marcador na cadeia polimérica, indicando uma degradação desse grupamento reativo, o que inviabiliza a utilização desse catalisador. Essa degradação pode ter sido ocasionada tanto pelo

uso do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalisador da polimerização ou da alta temperatura empregada na polimerização.

7.2. Conjugação do IR780 ao PLA

Yu e colaboradores (2012) modificaram a molécula de IR780, inserindo um grupo azida no lugar do átomo de cloro, visando o desenvolvimento de uma sonda fluorescente para detecção de sulfeto de hidrogênio em células vivas. Segundo os autores, o IR780- N_3 , em tampão HEPES 40 mM pH 7.4, apresentou uma banda de absorção centrada em 610 nm. Entretanto, o espectro de varredura para o produto obtido neste trabalho, sintetizado de acordo com a metodologia descrita pelos autores, não apresentou absorção em comprimento de onda próximo ao descrito pelos autores, sendo observada apenas uma pequena banda de absorção centrada em 397 nm.

Considerando a instabilidade de azidas orgânicas, é possível que a molécula de IR780- N_3 formada tenha se degradado durante o processo, uma vez que não se observa absorção característica da molécula precursora ($\lambda_{\text{máx}}$: 780 nm), indicando que a mesma foi consumida durante a reação, e que o produto obtido não apresenta as propriedades foto-físicas esperadas.

No trabalho desenvolvido por Yu e colaboradores (2012), é possível observar indícios da baixa estabilidade do IR780- N_3 obtido, como o baixo rendimento da reação (35%) e a necessidade de realizar toda a purificação do produto obtido em um curto espaço de tempo (30 min) e em atmosfera inerte.

Diante da dificuldade de obtenção da molécula de IR780- N_3 de maneira isolada pelo método descrito na literatura, suspeitando-se a degradação do produto formado, optou-se pela realização da conjugação do IR780 ao BCN-PLA via reação multicomponente, na qual o marcador com azida é formado *in situ*, na presença do polímero contendo um grupamento alcino. Assim, o IR780- N_3 formado pode reagir com o alcino presente na cadeia polimérica, antes que ocorra a sua degradação.

Dentre os polímeros sintetizados, o PLA_{4k}, PLA_{8k} e PLA_{20k} foram selecionados para a realização da conjugação do IR780 por apresentarem massas molares variadas, permitindo avaliar a influência do tamanho da cadeia polimérica na reação de conjugação. Análises por espectrofotometria no UV-VIS-NIR e CLAE/UV-VIS confirmaram a inserção do IR780 à cadeia polimérica de PLA.

A CLAE é uma técnica de separação amplamente utilizada na química de polímeros, sendo um dos principais métodos para determinar a distribuição de funcionalidades ao longo da cadeia de polímeros sintéticos. Quando utilizada para análise de polímeros, a CLAE é denominada de cromatografia de polímeros por eluição em gradiente (GEPC, do inglês *gradient elution polymer chromatography*) (POMERANZ; OLESIK, 2011; STRIEGEL, 2002, 2003).

O BCN-PLA não absorve no comprimento de onda utilizado (700 nm), de modo que o sinal do detector de UV-Vis observado é decorrente da presença do IR780 na amostra. Conforme observado, o IR780 livre apresenta um tempo de retenção próximo a 3 min. Quando ligado à cadeia de PLA, o IR780 apresenta um maior tempo de retenção, devido ao aumento da sua lipofilia em relação ao precursor livre. Essas diferenças no tempo de retenção permitem identificar se o marcador foi conjugado, ou não, à cadeia polimérica do PLA.

A comparação entre os três cromatogramas demonstra que o tempo de retenção variou de acordo com o tamanho da cadeia polimérica, sendo que menores massas molares apresentam menor tempo de retenção. Essa observação está de acordo com o conhecido aumento da lipofilia do PLA com o aumento do grau de polimerização nessa faixa de massas molares (D'ADDIO et al., 2012). Além disso, observa-se uma maior intensidade do sinal de UV para o polímero de menor \bar{M}_n , indicando que polímeros menores apresentam maior capacidade de conjugação. Essa relação também foi observada durante a análise da reatividade dos polímeros utilizando a azidocumarina. Esse fato pode ser atribuído à contribuição de três fatores: (1) para uma mesma massa de polímero, uma menor \bar{M}_n representa uma maior concentração de grupamentos reativos disponíveis para conjugação; (2) com o aumento do tamanho das cadeias poliméricas ocorre uma redução da mobilidade no meio reacional e (3) cadeias poliméricas maiores tendem a se enrolar em estruturas globulares e o grupo reativo alcino presente no final da cadeia pode ficar orientado de maneira que impeça o contato com o grupo azida complementar do marcador, gerando impedimento estérico e reduzindo a reatividade.

A técnica de RMN é uma técnica poderosa para identificação da estrutura molecular de um composto e da sua modificação química. Porém, a reação de SPAAC entre o IR780 e o BCN-PLA, com a formação do anel triazol, envolve a modificação de grupamentos químicos que não possuem hidrogênios e não afeta a nuvem eletrônica de hidrogênios próximos. Outro fator limitante é a concentração da amostra a ser analisada. A concentração do marcador fica baixa, podendo estar abaixo do limite de detecção. Isto ocorre porque somente o fim de cadeia do polímero sofre modificação, sendo necessária uma massa elevada de substância para a identificação de um único grupo químico numa molécula de massa molar alta. No entanto, a amostra não pode apresentar uma concentração elevada demais, pois pode aumentar a viscosidade do meio, dificultando a análise. Desse modo, esta técnica não foi ideal para determinar o sucesso da reação de conjugação. Entretanto, os resultados obtidos por RMN associados aos resultados por CLAE corroboram a formação do IR-PLA.

Foi avaliada também a possibilidade de inserção do IR780 em uma cadeia de P(LA-co-PGE). Devido à baixa reatividade do grupo alcino presente no PGE, foi utilizado o cobre como catalisador da reação. Entretanto, o produto obtido não apresentou absorção em comprimentos de onda característicos do marcador, quando analisado por espectrofotometria no UV-VIS-NIR, indicando que a reação não foi bem-sucedida.

Além da baixa reatividade do grupo propargila em relação ao alcino cíclico ativado do BCN, o uso de catalisador faz com que esta reação seja mais complexa, devido a necessidade do encontro de mais moléculas no meio reacional em mais etapas. Assim, a velocidade de reações *click* dependem de diversos fatores, como o tipo de alcino, solvente e o catalisador utilizados (REMZI BECER; HOOGENBOOM; SCHUBERT, 2009; ZOU et al., 2018). Por isso é possível que a reação entre o PLA-co-PGE e o IR780 ocorra de maneira lenta e com baixo rendimento, não sendo possível observar a formação do produto desejado nas condições utilizadas.

Desse modo, o BCN-PLA se mostrou mais adequado para a obtenção de um polímero conjugado com o marcador IR780.

Estudos prévios demonstraram a conjugação do IR780 a cadeias poliméricas, por outras vias reacionais, como PEG_{2k} (YUAN et al., 2015), a um copolímero em bloco de polietilenoglicol e um derivado metacrilato do succinato de α -tocoferol (PEG-*b*-poliMTOS) (PALAO-SUAY et al., 2017) e ao ácido hialurônico (LIN et al., 2017).

Apesar desses relatos prévios de modificação na estrutura química do IR780, o presente estudo é o primeiro exemplo de ligação desse marcador por química click e também o primeiro exemplo de ligação a um poliéster biodegradável.

7.4. Preparo e caracterização de nanopartículas contendo o IR-PLA

7.4.1. Caracterização por tamanho, Pdl, potencial zeta e fluorescência

Diversos sistemas de nanocarreadores contendo o IR780 já foram descritos na literatura, para aplicações em técnicas de imagem por fluorescência e em terapias fotodinâmica e fototérmica para tratamento de tumores, conforme revisado por Alves e colaboradores (2018).

A inflamação associada à região tumoral aumenta a permeabilidade dos vasos e gera a presença de fenestras na parede endotelial dos vasos sanguíneos que irrigam os tumores. Além disso, a drenagem linfática da região tumoral é dificultada, o que gera o efeito de aumento da permeabilidade vascular e retenção de partículas de tamanho reduzido nesses locais (efeito EPR- *enhanced permeation and retention effect*). Como amplamente descrito na literatura, partículas com tamanho reduzido tendem a se acumular em tecidos tumorais (MAEDA et al., 2000).

As nanopartículas obtidas neste trabalho apresentaram um tamanho nanométrico, com diâmetros hidrodinâmicos variando de 70 a 170 nm. As NC apresentaram diâmetros maiores que as NS, devido à presença do núcleo oleoso, e potencial zeta mais negativo, devido à presença de ácidos graxos na lecitina de soja (Lipoid® S75) utilizada no preparo das nanocápsulas (MOSQUEIRA et al., 2000). A presença de uma carga superficial negativa garante a estabilidade coloidal das suspensões, devido a repulsão eletrostática entre as partículas. Adicionalmente, a presença de PEG na superfície das partículas confere uma estabilidade frente à opsonização por impedimento estérico.

Trindade e colaboradores (2018) prepararam nanocápsulas utilizando os polímeros PCL, PLA, PLGA e PEG-PLA e encapsularam o marcador DIL. Os valores de tamanho, Pdl e potencial zeta foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

A análise das propriedades fotofísicas do IR-PLA e das nanopartículas demonstram que a capacidade de emitir energia sob a forma de fluorescência do

IR780 foi mantida após a reação de conjugação com o BCN-PLA, permitindo a formação de nanopartículas fluorescentes. A manutenção da fluorescência do IR780 após modificações em sua estrutura química foi demonstrada por outros autores ao utilizarem o IR780 modificado presente em nanoestruturas como marcador fluorescente em técnicas de imagem *in vitro* (LIN et al., 2017) e *in vivo* (YUAN et al., 2015).

Foi observado que em concentrações elevadas de IR-PLA ocorre uma supressão da fluorescência (*quenching*). Essa supressão pode ter ocorrido devido a um efeito denominado de filtro interno, no qual o fóton de luz emitido por uma molécula é reabsorvido por outra molécula no meio (FONIN et al., 2014).

Também foi observado que, para uma mesma concentração de partículas, a amostra preparada em acetonitrila apresentou uma maior intensidade de fluorescência, quando comparada à amostra analisada em água. Essa supressão da fluorescência pode ocorrer devido à perda de energia da molécula por processos não radiativos através da colisão de moléculas de IR780 presentes na superfície da nanoesfera com a água do meio.

7.4.2. Avaliação da interação das nanopartículas com proteínas séricas por fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4-MALS-FLD)

O fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) é uma técnica de separação em meio aquoso, utilizada para separar componentes de uma amostra coloidal, em função do seu coeficiente de difusão, ou seja, do seu tamanho, numa faixa que varia de apenas alguns nanômetros até, aproximadamente, 800 nm.

Em amostras de nanopartículas é possível separar frações de diâmetro uniforme dentro de uma amostra polidispersa, e caracterizar com precisão a polidispersidade da amostra através do tamanho de cada fração e da proporção relativa das frações. Ao nosso sistema de separação são associados detectores de modo que o tamanho das frações, eluindo em fluxo contínuo, é determinado por duas técnicas de espalhamento de luz em paralelo: o espalhamento de luz estático (MALS), que determina o diâmetro de giracão (que considera a distribuição dos pontos de massa em relação ao centro de massa da partícula) e o espalhamento de luz dinâmico (DLS), que determina o diâmetro hidrodinâmico e está relacionado ao coeficiente de

difusão da partícula no eluente. A proporção de cada fração é obtida utilizando a detecção por absorção no UV, sendo que em 254 nm o sinal detectado é principalmente devido ao espalhamento da luz incidente, ou seja, uma medida da turbidez da fração eluente.

Além disso, foi desenvolvida uma metodologia para estudar a partição e a transferência de marcadores fluorescentes de nanopartículas para proteínas do soro. Essa metodologia foi previamente descrita por Trindade e colaboradores (2018). Este estudo consiste na incubação da amostra de nanopartículas fluorescentes em meio contendo proteínas do soro, seguida da separação da mistura no canal de AF4, e caracterização das frações por detector de fluorescência. As proteínas do soro possuem um diâmetro reduzido (<10 nm), sendo eluídas como um pico fino com tempo de retenção inferior ao das nanopartículas. Comparando as áreas dos picos de fluorescência é possível determinar a contribuição da fluorescência associada às proteínas e a fluorescência associada às nanopartículas, a partir da amostra complexa.

Trindade e colaboradores (2018) utilizaram a técnica de AF4-MALS-FLD para avaliar a estabilidade de NC de PCL, PLA, PLGA e PEG-PLA contendo o marcador DIL em meio DMEM contendo 10% de FBS. Os autores observaram, para todas as formulações estudadas, que ocorre apenas uma pequena transferência do marcador para as proteínas do FBS ao longo do tempo de incubação. O marcador DIL possui um caráter altamente lipofílico, permanecendo fortemente associado ao núcleo oleoso das nanocápsulas estudadas, não sendo transferido para as proteínas.

Aplicando-se essa técnica às NS preparadas com IR780, foi evidenciada uma diferença fundamental em termos de marcação fluorescente. As NS com IR780 conjugado ao PLA mantiveram a sua fluorescência e somente uma fração mínima da fluorescência foi associada às proteínas do soro, ao passo que as NS com IR780 encapsulado apresentam fluorescência intensa associada às proteínas, com aumento em função do tempo, indicando um processo de transferência prolongado. Ou seja, quando o IR780 está encapsulado na NS, ele passa rapidamente da NS para as proteínas, o que compromete a confiabilidade de testes *in vitro* e *in vivo*. Isso corrobora o fato da ligação do IR780 covalentemente ao polímero garantir a estabilidade da marcação fluorescente das nanopartículas.

As NC preparadas com IR-PLA associado aos polímeros PCL, PLGA e PEG-PLA, quando incubadas em meio contendo proteínas do soro, também apresentaram uma fluorescência estável, com apenas uma pequena fração de marcador associado às proteínas. Essa fração de IR780 que é transferida para as proteínas pode ser decorrente da presença de uma pequena fração do marcador que não foi conjugado ao polímero, uma vez que o mesmo não passa por processo de purificação para a remoção do marcador livre.

Outros métodos são descritos na literatura para avaliar a interação de nanopartículas com as proteínas séricas, embora cada método apresente as suas limitações. Em seu trabalho, Pietkiewicz, Wilk e Bazylińska (2016) utilizaram duas metodologias para avaliar o grau de interação de NS de PLA contendo diferentes substâncias hidrofóbicas (curcumina, ftalocianina de zinco e IR780) com a albumina (BSA). A primeira consiste na determinação da intensidade de fluorescência, medida utilizando o comprimento de onda de máxima excitação específico de cada fluoróforo, associada às proteínas que estavam imobilizadas em um suporte sólido, após incubação com as formulações. A segunda metodologia consistiu na determinação da absorvância em 280 nm por espectrofotometria no UV-VIS de amostras contendo uma concentração pré-determinada de NS incubadas com concentrações crescentes de BSA. Segundo os autores, a NS com curcumina apresentou maior interação com a BSA, seguida da NS com ftalocianina de zinco e da NS com IR780, sugerindo uma capacidade elevada das NS em encapsular e reter IR780 em relação aos demais compostos.

Conforme demonstrado pelas nossas análises por AF4, quando a amostra de NP contendo um marcador é incubada com meio contendo proteínas, pode ocorrer uma transferência do marcador da partícula para as proteínas. O método de AF4 evidencia a associação de marcador fluorescente às proteínas, já que é um método em fluxo que permite uma separação dos componentes nanométricos dentro de uma amostra complexa em função do tamanho, ao passo que as metodologias em batelada não são capazes de diferenciar a associação de NP às proteínas da transferência do marcador para proteínas. Assim, o método de AF4 se mostrou uma potente ferramenta para auxiliar na compreensão da interação entre proteínas e nanopartículas; e entre fármacos associados fisicamente a nanopartículas e proteínas.

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi obtido um PLA reativo, através de uma polimerização por abertura de anel utilizando uma base orgânica forte (TBD) como catalisador e iniciador (BCN-OH) possuindo o grupo reativo ciclooctila. Com melhorias das condições de secagem dos reagentes, foi possível obter polímeros com as características desejadas, em termos de massa molar, distribuição de massas (polímeros com \bar{M}_n 8000 e 4000 g/mol) e reatividade a azidas orgânicas, apesar da baixa reprodutibilidade dessa reação em termos de massa molar do polímero.

Foi desenvolvida uma rota sintética para conjugação do marcador fluorescente IR780 ao PLA contendo o grupamento alcino reativo (BCN-PLA), via reação multicomponente de cicloadição azida-alcino promovida por tensão de ciclo na ausência de catalisador. Além da simplicidade dessa reação e alto rendimento, a reação multicomponente foi necessária para contornar a instabilidade do intermediário IR-N₃ demonstrada nesse trabalho.

O PLA conjugado ao marcador IR780 obtido apresentou características fotofísicas adequadas de fluorescência NIR, que validam seu potencial em estudos pré-clínicos de biodistribuição de nanopartículas. Uma das características mais interessante desse marcador polimérico NIR foi a estabilidade da marcação fluorescente de nanopartículas em meio aquoso, mesmo em condições semelhantes a estudos *in vitro* (37°C e na presença de proteínas séricas), quando comparado com o marcador encapsulado.

Sendo assim, o IR-PLA mostrou ser um marcador fluorescente polimérico versátil, que pode ser associado a diferentes poliésteres biodegradáveis para a marcação dos nanocarreadores mais seguros e mais utilizados na área farmacêutica.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

São perspectivas para trabalhos futuros provenientes dos resultados obtidos nesse trabalho:

- Aprimorar as metodologias sintéticas desenvolvidas, visando a obtenção de melhor controle da massa molar dos polímeros;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade do IR-PLA;
- Avaliar o uso do IR-PLA na marcação de nanopartículas em estudos de internalização celular por microscopia confocal e citometria de fluxo;
- Avaliar o uso do IR-PLA na marcação de nanopartículas em estudos de biodistribuição *in vivo*.
- Avaliar a atividade *in vitro* do IR-PLA em terapia fotodinâmica/fototérmica para o tratamento de tumor.

REFERÊNCIAS

AGARD, N. J.; PRESCHER, J. A.; BERTOZZI, C. R. A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 46, p. 15046–15047, 2004.

AKERROYD, N.; KLUMPERMAN, B. The combination of living radical polymerization and click chemistry for the synthesis of advanced macromolecular architectures. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 6, p. 1207–1231, 2011.

ALVES, C. G.; LIMA-SOUSA, R.; DE MELO-DIOGO, D.; LOURO, R. O.; CORREIA, I. J. IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 542, n. 1–2, p. 164–175, maio 2018.

BAZYLIŃSKA, U.; LEWIŃSKA, A.; LAMCH, Ł.; WILK, K. A. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 42–49, fev. 2014.

BERTRAND, N.; LEROUX, J. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 152–163, jul. 2012.

D'ADDIO, S. M.; SAAD, W.; ANSELL, S. M.; SQUIERS, J. J.; ADAMSON, D. H.; HERRERA-ALONSO, M.; WOHL, A. R.; HOYE, T. R.; MACOSKO, C. W.; MAYER, L. D.; VAUTHIER, C.; PRUD'HOMME, R. K. Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from in vivo clearance. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 208–217, ago. 2012.

DERVAUX, B.; DU PREZ, F. E. Heterogeneous azide–alkyne click chemistry: towards metal-free end products. **Chem. Sci.**, v. 3, n. 4, p. 959–966, 2012.

DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer Vesicles. **Science**, v. 297, n. 5583, p. 967–973, 9 ago. 2002.

EL HABNOUNI, S.; DARCOS, V.; GARRIC, X.; LAVIGNE, J.-P.; NOTTELET, B.; COUDANE, J. Mild Methodology for the Versatile Chemical Modification of Polylactide Surfaces: Original Combination of Anionic and Click Chemistry for Biomedical Applications. **Advanced Functional Materials**, v. 21, n. 17, p. 3321–3330, 9 set. 2011.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FONIN, A. V.; SULATSKAYA, A. I.; KUZNETSOVA, I. M.; TUROVEROV, K. K. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103878, 29 jul. 2014.

GOLAS, P. L.; MATYJASZEWSKI, K. Marrying click chemistry with polymerization:

expanding the scope of polymeric materials. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 4, p. 1338–1354, 2010.

HAN, H.; WANG, J.; CHEN, T.; YIN, L.; JIN, Q.; JI, J. Enzyme-sensitive gemcitabine conjugated albumin nanoparticles as a versatile theranostic nanoplatform for pancreatic cancer treatment. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 507, p. 217–224, dez. 2017.

HEIN, C. D.; LIU, X.-M.; WANG, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 10, p. 2216–2230, 29 out. 2008.

HUDLIKAR, M. S.; LI, X.; GAGARINOV, I. A.; KOLISHETTI, N.; WOLFERT, M. A.; BOONS, G.-J. Controlled Multi-functionalization Facilitates Targeted Delivery of Nanoparticles to Cancer Cells. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 4, p. 1415–1423, 22 jan. 2016.

HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MÖBIUS, L. 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. **Chemische Berichte**, v. 100, n. 8, p. 2494–2507, ago. 1967.

JIANG, C.; CHENG, H.; YUAN, A.; TANG, X.; WU, J.; HU, Y. Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 14, p. 61–69, 2015.

JOKERST, J. V.; LOBOVKINA, T.; ZARE, R. N.; GAMBHIR, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 715–728, jun. 2011.

KIESEWETTER, M. K.; SCHOLTEN, M. D.; KIRN, N.; WEBER, R. L.; HEDRICK, J. L.; WAYMOUTH, R. M. Cyclic Guanidine Organic Catalysts: What Is Magic About Triazabicyclodecene? **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 24, p. 9490–9496, 18 dez. 2009.

KROVI, S. A.; SMITH, D.; NGUYEN, S. T. “Clickable” polymer nanoparticles: a modular scaffold for surface functionalization. **Chemical Communications**, v. 46, n. 29, p. 5277, 2010.

LEOPHAIRATANA, P.; DE SILVA, C. C.; KOBERSTEIN, J. T. How good is CuAAC “click” chemistry for polymer coupling reactions? **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 75–84, 1 jan. 2018.

LI, F.; DONG, J.; HU, X.; GONG, W.; LI, J.; SHEN, J.; TIAN, H.; WANG, J. A Covalent Approach for Site-Specific RNA Labeling in Mammalian Cells. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 15, p. 4597–4602, 7 abr. 2015.

LI, H.; WANG, K.; YANG, X.; ZHOU, Y.; PING, Q.; OUPICKY, D.; SUN, M. Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: Anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 399–413, 2016.

LI, S.; JOHNSON, J.; PECK, A.; XIE, Q. Near infrared fluorescent imaging of brain

tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 18, 23 dez. 2017.

LIÉNARD, R.; ZALDUA, N.; JOSSE, T.; WINTER, J. DE; ZUBITUR, M.; MUGICA, A.; ITURROSPE, A.; ARBE, A.; COULEMBIER, O.; MÜLLER, A. J. Synthesis and Characterization of Double Crystalline Cyclic Diblock Copolymers of Poly(ϵ -caprolactone) and Poly(l(d)-lactide) (c(PCL-b- PL(D)LA)). **Macromolecular Rapid Communications**, v. 37, n. 20, p. 1676–1681, out. 2016.

LIN, T.; YUAN, A.; ZHAO, X.; LIAN, H.; ZHUANG, J.; CHEN, W.; ZHANG, Q.; LIU, G.; ZHANG, S.; CHEN, W.; CAO, W.; ZHANG, C.; WU, J.; HU, Y.; GUO, H. Self-assembled tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photothermal ablation in orthotopic bladder cancer. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 427–438, abr. 2017.

LUTZ, J.-F.; BÖRNER, H. G.; WEICHENHAN, K. Combining ATRP and “Click” Chemistry: a Promising Platform toward Functional Biocompatible Polymers and Polymer Bioconjugates. **Macromolecules**, v. 39, n. 19, p. 6376–6383, set. 2006.

MACHADO, M. G. C. **Em preparação**, não publicado.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1–2, p. 271–284, mar. 2000.

MORTON, S. W.; ZHAO, X.; QUADIR, M. A.; HAMMOND, P. T. FRET-enabled biological characterization of polymeric micelles. **Biomaterials**, v. 35, n. 11, p. 3489–3496, 2014.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2967–2979, nov. 2001.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L- Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, maio 2000.

NOTTELET, B.; DARCOS, V.; COUDANE, J. Aliphatic polyesters for medical imaging and theranostic applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 350–370, 2015.

PAIS-SILVA, C.; DE MELO-DIOGO, D.; CORREIA, I. J. IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 108–117, 2017.

PALAO-SUAY, R.; MARTÍN-SAAVEDRA, F. M.; ROSA AGUILAR, M.; ESCUDERODUCH, C.; MARTÍN-SALDAÑA, S.; PARRA-RUIZ, F. J.; ROHNER, N. A.; THOMAS, S. N.; VILABOIA, N.; SAN ROMÁN, J. Photothermal and photodynamic activity of polymeric nanoparticles based on α -tocopheryl succinate-RAFT block copolymers conjugated to IR-780. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 70–84, jul. 2017.

PIETKIEWICZ, J.; WILK, K. A.; BAZYLIŃSKA, U. In vitro studies of serum albumin interaction with poly(d, l-lactide) nanospheres loaded by hydrophobic cargo. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 426–435, jan. 2016.

POMERANZ, C. N.; OLESIK, S. V. Separation of poly-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxybutyrate through gradient polymer elution chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 44, p. 7943–7947, nov. 2011.

POUND-LANA, G.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P.; MOSQUEIRA, V. C. F. Functional polylactide via ring-opening copolymerisation with allyl, benzyl and propargyl glycidyl ethers. **European Polymer Journal**, v. 90, n. March, p. 344–353, 2017.

PRATT, R. C.; LOHMEIJER, B. G. G.; LONG, D. A.; WAYMOUTH, R. M.; HEDRICK, J. L. Triazabicyclodecene : A Simple Bifunctional Organocatalyst for Acyl Transfer and Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters Triazabicyclodecene: A Simple Bifunctional Organocatalyst for Acyl Transfer and Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 14, p. 4556–4557, 2006.

PRETULA, J.; SLOMKOWSKI, S.; PENCZEK, S. Polylactides—Methods of synthesis and characterization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 3–16, dez. 2016.

REMZI BECER, C.; HOOGENBOOM, R.; SCHUBERT, U. S. Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 27, p. 4900–4908, 2009.

ROBB, M. J.; CONNAL, L. A.; LEE, B. F.; LYND, N. A.; HAWKER, C. J. Functional block copolymer nanoparticles: toward the next generation of delivery vehicles. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 1618, 2012.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596–2599, 15 jul. 2002.

SAINI, P.; ARORA, M.; KUMAR, M. N. V. R. Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 47–59, 2016.

SAMANTA, A.; VENDRELL, M.; DAS, R.; CHANG, Y.-T. Development of photostable near-infrared cyanine dyes. **Chemical Communications**, v. 46, n. 39, p. 7406, 2010.

STRIEGEL, A. M. Determining the vinyl alcohol distribution in poly(vinyl butyral) using normal-phase gradient polymer elution chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 971, n. 1–2, p. 151–158, set. 2002.

STRIEGEL, A. M. Determining and correcting “moment bias” in gradient polymer elution chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 996, n. 1–2, p. 45–51, maio 2003.

TAN, X.; LUO, S.; WANG, D.; SU, Y.; CHENG, T.; SHI, C. A NIR heptamethine dye with intrinsic cancer targeting, imaging and photosensitizing properties. **Biomaterials**,

v. 33, n. 7, p. 2230–2239, mar. 2012.

TASDELEN, M. A.; KISKAN, B.; YAGCI, Y. Externally stimulated click reactions for macromolecular syntheses. **Progress in Polymer Science**, v. 52, p. 19–78, jan. 2016.

TIAN, H.; SAKMAR, T. P.; HUBER, T. A simple method for enhancing the bioorthogonality of cyclooctyne reagent. **Chemical Communications**, v. 52, n. 31, p. 5451–5454, 2016.

TRINDADE, I. C.; POUND-LANA, G.; PEREIRA, D. G. S.; DE OLIVEIRA, L. A. M.; ANDRADE, M. S.; VILELA, J. M. C.; POSTACCHINI, B. B.; MOSQUEIRA, V. C. F. Mechanisms of interaction of biodegradable polyester nanocapsules with non-phagocytic cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 124, n. May, p. 89–104, nov. 2018.

TYLER, B.; GULLOTTI, D.; MANGRAVITI, A.; UTSUKI, T.; BREM, H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163–175, dez. 2016.

VAN DEN BERG, S. A.; ZUILHOF, H.; WENNEKES, T. Clickable Polylactic Acids by Fast Organocatalytic Ring-Opening Polymerization in Continuous Flow. **Macromolecules**, v. 49, n. 6, p. 2054–2062, 2016a.

VAN DEN BERG, S. A.; ZUILHOF, H.; WENNEKES, T. Clickable Polylactic Acids by Fast Organocatalytic Ring-Opening Polymerization in Continuous Flow. **Macromolecules**, v. 49, n. 6, p. 2054–2062, 22 mar. 2016b.

WANG, C.; TAO, H.; CHENG, L.; LIU, Z. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6145–6154, set. 2011.

WANG, K.; ZHANG, Y.; WANG, J.; YUAN, A.; SUN, M.; WU, J.; HU, Y. Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27421, 2016.

WANG, S.; YANG, X.; ZHU, W.; ZOU, L.; ZHANG, K.; CHEN, Y.; XI, F. Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition “click” as a conjugation tool for building topological polymers. **Polymer**, v. 55, n. 19, p. 4812–4819, set. 2014.

XIE, M.; SHI, H.; MA, K.; SHEN, H.; LI, B.; SHEN, S.; WANG, X.; JIN, Y. Hybrid nanoparticles for drug delivery and bioimaging: Mesoporous silica nanoparticles functionalized with carboxyl groups and a near-infrared fluorescent dye. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 395, n. 1, p. 306–314, 2013.

YANG, X.; LI, H.; QIAN, C.; GUO, Y.; LI, C.; GAO, F.; YANG, Y.; WANG, K.; OUPICKY, D.; SUN, M. Near-infrared light-activated IR780-loaded liposomes for anti-tumor angiogenesis and Photothermal therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2283–2294, out. 2018.

YEN, S. K.; JAŃCZEWSKI, D.; LAKSHMI, J. L.; DOLMANAN, S. BIN; TRIPATHY, S.; HO, V. H. B.; VIJAYARAGAVAN, V.; HARIHARAN, A.; PADMANABHAN, P.;

BHAKOO, K. K.; SUDHAHARAN, T.; AHMED, S.; ZHANG, Y.; TAMIL SELVAN, S. Design and Synthesis of Polymer-Functionalized NIR Fluorescent Dyes–Magnetic Nanoparticles for Bioimaging. **ACS Nano**, v. 7, n. 8, p. 6796–6805, 27 ago. 2013.

YU, F.; LI, P.; SONG, P.; WANG, B.; ZHAO, J.; HAN, K. An ICT-based strategy to a colorimetric and ratiometric fluorescence probe for hydrogen sulfide in living cells. **Chemical Communications**, v. 48, n. 23, p. 2852, 2012.

YU, Y.; ZOU, J.; CHENG, C. Synthesis and biomedical applications of functional poly(α -hydroxyl acid)s. **Polym. Chem.**, v. 5, n. 20, p. 5854–5872, 2014.

YU, Y.; ZOU, J.; YU, L.; JI, W.; LI, Y.; LAW, W.; CHENG, C. Functional Polylactide-*g*-Paclitaxel–Poly(ethylene glycol) by Azide–Alkyne Click Chemistry. **Macromolecules**, v. 44, n. 12, p. 4793–4800, 28 jun. 2011.

YUAN, A.; QIU, X.; TANG, X.; LIU, W.; WU, J.; HU, Y. Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for in vivo imaging and cancer therapy. **Biomaterials**, v. 51, p. 184–193, maio 2015.

ZHANG, C.; LIU, T.; SU, Y.; LUO, S.; ZHU, Y.; TAN, X.; FAN, S.; ZHANG, L.; ZHOU, Y.; CHENG, T.; SHI, C. A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging. **Biomaterials**, v. 31, n. 25, p. 6612–6617, set. 2010a.

ZHANG, C.; WANG, S.; XIAO, J.; TAN, X.; ZHU, Y.; SU, Y.; CHENG, T.; SHI, C. Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1911–1917, 2010b.

ZHENG, J.; LIU, K.; RENEKER, D. H.; BECKER, M. L. Post-Assembly Derivatization of Electrospun Nanofibers via Strain-Promoted Azide Alkyne Cycloaddition. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 41, p. 17274–17277, 17 out. 2012.

ZHU, W.; LI, Z.; SUN, P.; REN, L.; ZHANG, K. T-shaped and H-shaped polymers constructed from UV-induced strain promoted azide-alkyne cycloaddition reaction. **Polymer**, v. 86, p. 1–7, mar. 2016.

ZOU, Y.; ZHANG, L.; YANG, L.; ZHU, F.; DING, M.; LIN, F.; WANG, Z.; LI, Y. “Click” chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 273, n. 4, p. 160–179, mar. 2018.