

Santiago Gutiérrez Restrepo

***Preparação e avaliação de micro e nanopartículas de
fibroína da seda para liberação controlada de fármacos***

São Carlos

2019

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia

Santiago Gutiérrez Restrepo

***Preparação e avaliação de micro e nanopartículas de
fibroína da seda para liberação controlada de fármacos***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Instituto de Química de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka

Área de concentração: Bioengenharia

Versão corrigida

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE
ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Gutiérrez , Santiago	
G983p	Preparação e avaliação de micro e nanopartículas de fibroína da seda para liberação controlada de fármacos / Santiago Gutiérrez ; orientador Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka. São Carlos, 2019.
	Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
	Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2019.
	1. fibroína da seda. 2. nanopartículas. 3. micropartículas. 4. liberação de fármacos. 5. Nano Spray Dryer. 6. doxorrubicina. 7. zidovudina. I.Título.

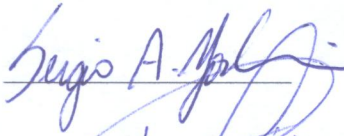



Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Santiago Gutierrez Restrepo

Título: “Preparação e avaliação de micro e nanopartículas de fibroína da seda para liberação controlada de fármacos”

Data da defesa: 22/03/2019

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Sergio Akinobu Yoshioka UNICAMP		Não Votante
Prof(a). Dr(a). Laudemir Carlos Varanda IQSC/USP		Aprovado
Prof(a). Dr(a). Adriano Marim de Oliveira IPT		Aprovado
Prof(a). Dr(a). Valtencir Zucolotto IFSC/USP		Aprovado

Dedico este trabalho a minha família, que sempre estiveram me apoiando e me incentivando a dar o meu melhor cada dia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, às pessoas mais importantes da minha vida, pelo seu amor e sabedoria. Vocês são a minha maior motivação!

Ao meu pai pelos seus conselhos e dicas nos momentos mais necessários. À minha mãe pela sua voz doce e por sempre acreditar em mim. Aos meus irmãos, por estarem sempre disponíveis para me ouvir e me apoiar, amo vocês! Ao resto de minha família que ajudou a me tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka, pela oportunidade, orientação e por acreditar na fibroína da seda e seus usos como biomaterial.

À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, pela ajuda, paciência e apoio ao longo do projeto.

À Marcia Maria Hyppolito Geromini, pela ajuda e paciência nos assuntos burocráticos na secretaria do programa.

Aos colegas do grupo de pesquisa de bioquímica e biomateriais pela ajuda, amizade e boas lembranças.

Ao Dr. Adriano Marim de Oliveira pela sua orientação e aos colegas do núcleo de bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas pela ajuda e aprendizados durante o programa de Novos Talentos.

Ao Prof. Dr. Joseph Matt Kinsella pela sua orientação e aos colegas do departamento de bioengenharia da McGill University pela sua acolhida e aprendizados durante o programa de líderes emergentes da América Latina.

Ao Ezequias, por acreditar em mim e sempre ter o sorriso adequado para me deixar mais feliz. Sem você tudo isso teria sido muito mais difícil.

À Liliana pelas dicas de vida e a luz que colocou nesse processo.

Aos funcionários da central de análises químicas do Instituto de Química de São Carlos, especialmente ao Dr. Márcio de Paula e o Dr. Aldimar Tadeu Jesuino Constante.

Ao Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro e à Dra. Ana Paula Garcia Ferreira, do laboratório de análise química, eletroanalítica e química de Soluções do Instituto de Química de São Carlos pela ajuda nas análises termogravimétricas.

Ao Dr. Valdecir A. Paganin do grupo de eletroquímica do Instituto de Química de São Carlos pela ajuda nos testes de espalhamento dinâmico de luz.

À Ariane Simões Tunussi pela ajuda e paciência durante o uso do equipamento de Nano Spray Dryer.

À Pooja Pushparaj pela sua amizade e ajuda nas caracterizações das amostras.

Ao Salvador Florez Torres pela sua amizade e ajuda com os testes com a doxorrubicina.

À Daniela pela companhia, risadas e apoio durante a estadia em Montreal.

Aos meus amigos Estefania, Andrés, Sarah, Melissa, Alejandra, Carine, Luiza, Lucas, Olibário, Murilo, Eduardo, Marília, pelo apoio, risadas, treinos, comidas, injeções de animo que ajudaram a que essa etapa da vida fosse mais leve e divertida.

À Fundação de Apoio ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo pela oportunidade de participar do programa Novos Talentos 2017.

Ao Governo canadense pela bolsa e a oportunidade de participar do programa líderes emergentes da América Latina 2018.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

“May your choices reflect your hopes, not your fears”

Nelson Mandela

RESUMO

GUTIERREZ, S. **Preparação e avaliação de micro e nanopartículas de fibroína da seda na liberação controlada de fármacos**. 2019. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos - EESC/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP / Instituto de Química de São Carlos – IQSC, Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, 2019.

A fibroína da seda (FS) é uma proteína proveniente do casulo do bicho da seda *Bombyx Mori*, largamente utilizada em várias aplicações médicas como biofilmes, *scaffolds*, membranas e géis devido a sua disponibilidade e biocompatibilidade. A necessidade de sistemas de liberação controlada de fármacos e princípios bioativos no corpo humano leva à busca de novos biomateriais com propriedades mais adequadas. Dentre as muitas alternativas, os micro e nanobiomateriais oferecem várias vantagens quando se objetiva a liberação controlada de substâncias devido a sua morfologia e tamanho. Assim, partículas de FS com um tamanho adequado e morfologia controlada podem apresentar potencial para serem carregadas com fármacos ou princípios ativos para aplicações na farmacologia moderna. O presente trabalho visou a obtenção de partículas de fibroína por diferentes métodos com o intuito de obter-se partículas com o menor tamanho e uniformidade possível. Além disso, o estudo da incorporação dessas partículas com diferentes moléculas bioativas e a avaliação do potencial das mesmas como suporte para liberação de fármacos. Assim, foram escolhidos três métodos de obtenção: aspersão em nitrogênio líquido, precipitação em solventes orgânicos miscíveis em água (etanol e metanol) e aspersão com o equipamento *Nano Spray Drying*. A caracterização das partículas foi feita via microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TGA), espalhamento de luz dinâmica (DLS) e potencial Zeta. Foram feitos modelos de incorporação com os corantes rodamina B (RhB) e cristal violeta (CV), assim como estudos de incorporação e liberação com dois fármacos: a doxorrubicina (DOX), um antitumoral; e a zidovudina (AZT), um antirretroviral. Foi possível obter partículas esféricas com tamanhos desde $185,1 \pm 2,8$ até $1214,3 \pm 559,9$ nm. Os parâmetros como polidispersividade e tamanho de partícula foram altamente dependentes do método de obtenção. Os estudos de incorporação e liberação mostraram que, no caso da DOX foi incorporada $81,92 \pm 2,08$ % após 24 h e houve uma liberação máxima de $83,55 \pm 1,58$ % no pH 9,0 após 6 h; já a AZT teve uma eficiência de incorporação por volta de $57,35 \pm 7,24$ % e a liberação das partículas obtidas por aspersão no *Nano Spray Dryer* (SF1T20) foi $36,94 \pm 5,65$ % maior do que nas partículas obtidas por precipitação em etanol (nEtOH) após 6 h. As amostras SF1T20 e nEtOH mostraram-se como materiais com alto potencial para a liberação controlada de fármacos.

Palavras chave: fibroína da seda, nanopartículas, micropartículas, liberação de fármacos, *Nano Spray Dryer*, doxorrubicina, zidovudina.

ABSTRACT

GUTIERREZ, S. **Preparation and evaluation of silk fibroin micro and nanoparticles as a controlled drug delivery system**. 2019. M. Sc thesis. Department of Bioengineering – São Carlos School of Engineering (EESC) / Ribeirão Preto Medical School (FMRP) / São Carlos Instituto of Chemistry (IQSC), University of São Paulo – USP, São Carlos, 2019.

Silk fibroin (SF) is a protein from *Bombyx mori* silkworm cocoons, that has been widely used in several biomedical application such as biofilms, scaffolds, membranes and gels; due to its availability and biocompatibility. The current need for new controlled drug delivery systems encourages searching for new biomaterials with better suited properties. Among several alternatives, micro and nanobiomaterials have advantages when it comes to a controlled release system due to its reactivity and morphology. Therefore, SF particles with an adequate particle size and controlled morphology might have the potential to be carriers for drug and bioactive ingredients for applications in modern pharmacology. This study aims the preparation of SF particles and evaluation of different synthesis methods in order to obtain smaller and more uniform particles, as well as study their interaction with drugs and active molecules evaluating its potential to be used as carriers. Three different synthesis method were studied: flash-frozen in liquid nitrogen, organic solvent precipitation (in ethanol and methanol), and formation using *Nano Spray Dryer*. Particles were characterized by optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), dynamic light scattering (DLS) and Zeta potential. Rhodamine B (RhB) and crystal violet (CV) were used as drug-loading models, and loading and release studies of and antitumoral drug, doxorubicin (DOX); and an antiretroviral drug, zidovudine (AZT) were performed. Spherical particles were obtained with particle size between $185,1 \pm 2,8$ and $1214,3 \pm 559,9$ nm. Polydispersity index, particle size, drug loading and release were highly dependent on the synthesis method. DOX loading efficiency was $81,92 \pm 2,08\%$ after 24 h and $83,55 \pm 1,58 \%$ was release at pH 9,0 after 6 h; for AZT loading efficiency was around $57,35 \pm 7,24 \%$ and release of particles obtained using *Nano Spray Dryer* was $36,94 \pm 5,65 \%$ higher than the ones obtained by precipitation in ethanol after 6 h. Both particles obtained by precipitation in ethanol and using the *Nano Spray Dryer* technique have potential for controlled release of the used drugs.

Keywords: silk fibroin, nanoparticles, microparticles, drug release, *Nano Spray Dryer*, doxorubicin, zidovudine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bicho da seda <i>Bombyx mori</i>	39
Figura 2. Estrutura da fibroína da seda (FS).	40
Figura 3. Estrutura da cadeia pesada da FS (A) e micela da FS (B).....	41
Figura 4. Representação gráfica de diferentes tipos de materiais micro e nanoparticulados.....	44
Figura 5. Esquema dos processos <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> na produção de nanomateriais.....	45
Figura 6. Equipamento de <i>Nano Spray Dryer</i> B-90 (direita) e esquema de funcionamento geral.....	47
Figura 7. Esquema do processo de geração de gotículas no <i>Nano Spray Dryer</i>	48
Figura 8. Esquema do sistema coletor de partículas do <i>Nano Spray Dryer</i>	49
Figura 9. Estrutura molecular da rodamina B.	52
Figura 10. Estrutura molecular do cristal violeta.....	53
Figura 11. Estrutura molecular da doxorrubicina.....	53
Figura 12. Estrutura molecular da zidovudina.	54
Figura 13. Curva de calibração para a rodamina B no comprimento de onda de 554 nm.	61
Figura 14. Curva de calibração para o cristal violeta no comprimento de onda de 577 nm.	62
Figura 15. Curva de calibração para a doxorrubicina (DOX) no comprimento de onda de 480 nm.	63
Figura 16. Curva de calibração para a zidovudina (AZT) no comprimento de onda de 266 nm.	64
Figura 17. Esquema métodos de obtenção, caracterização, incorporação e liberação das partículas.....	66
Figura 18. Partículas de FS obtidas por aspensão.....	67

Figura 19. Efeito Tyndall nas amostras nEtOH1 (A) e nMeOH(B).....	68
Figura 20. Partículas da amostra SF1T20 sendo coletadas do eletrodo cilíndrico do equipamento de <i>Nano Spray Dryer</i> . (vista transversal).....	69
Figura 21. Microscopia óptica de partículas de FS obtidas por aspersão em nitrogênio líquido aumentadas 10X (A) e 100X (B).....	70
Figura 22. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas por aspersão com aumentos de 350X (A); 1200X (B) e 30000X (C).	71
Figura 23. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas pelo método de precipitação em nEtOH (A) e nMeOH (B) com aumentos de 50000X....	72
Figura 24. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas da amostra SF1T20 secas no <i>Nano Spray Dryer</i> com aumentos (A) 10000X (B) e 25000X..	73
Figura 25. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas da amostra SF1T20AZT secas no <i>Nano Spray Dryer</i> com aumentos (A) 10000X (B) e 25000X..	74
Figura 26. Espectros no FT-IR das partículas obtidas por aspersão em nitrogênio líquido (—), precipitação em metanol (—), precipitação em etanol (—), aspersão no <i>Nano Spray Dryer</i> (—) e a fibra de FS antes de ser dissolvida (—).....	75
Figura 27. Análise termogravimétrica das partículas obtidas por aspersão em nitrogênio líquido (—), precipitação em etanol (—), aspersão no <i>Nano Spray Dryer</i> (—) e a fibra de FS (—) antes de ser dissolvida.....	78
Figura 28. Distribuições de tamanho por DLS para as amostras nEtOH1 (—), nEtOH2(· · ·), nMeOH (— —), SF1T20 (· — · — ·) e SF1T20AZT (—).....	79
Figura 29. Eficiência de incorporação dos corantes rodamina B (—) e cristal violeta (—) em nanopartículas da amostra nEtOH (■) e SF1T20 (▲)...	82
Figura 30. Eficiência de incorporação da doxorubicina (DOX) nas partículas obtidas pelo método de precipitação em etanol (●).....	84
Figura 31. Porcentagem de doxorubicina (DOX) liberada da amostra nEtOH a pH 5,0 (▲); 7,4 (■) e 9,0 (●).....	85

Figura 32. Eficiência de incorporação da AZT nas partículas obtidas por precipitação em etanol (□) e aspensão no <i>Nano Spray Dryer</i> (●).....	86
Figura 33. Perfil de liberação do AZT nas partículas obtidas por precipitação em etanol (□) e por aspensão no <i>Nano Spray Dryer</i> (●) em pH 7,4.....	87
Figura 34. Perfil de liberação do AZT da amostra SF1T20AZT obtida por aspensão no <i>Nano Spray Dryer</i> em pH 7,4.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações teste pelo método de <i>Nano Spray Drying</i>	59
Tabela 2. Bandas vibracionais presentes nos espectros no FT-IR das amostras obtidas.....	76
Tabela 3. Etapas de variação de temperaturas nas amostras de partículas obtidas.....	77
Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico das partículas obtidas por precipitação em solventes orgânicos (nEtOH1, nEtOH2 e nMeOH) e aspersão no equipamento <i>Nano Spray Dryer</i> (SF1T20, SF1T20AZT).....	79
Tabela 5. Análise do diâmetro hidrodinâmico no tempo para as amostras nEtOH1 e nMeOH.	80
Tabela 6. Valores de potencial Zeta para as amostras nEtOH2 e SF1T20.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C – antes de Cristo

AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome* (síndrome da imunodeficiência adquirida)

Ala – alanina

AZT – zidovudina ou azidotimidina

CV – cristal violeta

Da – dalton ou unidade de massa atômica

D_h – diâmetro hidrodinâmico

DLS – *dynamic light scattering* (espalhamento dinâmico de luz)

DOX – doxorrubicina

EC – eficiência de incorporação

FT-IR – *Fourier-transform infrared spectroscopy* (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)

FS – fibroína da seda

Gly – glicina

HIV – *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

IGF-I – *insulin-like growth factor 1* (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MM – massa molar

MWCO – *molecular weight cut-off* (corte de peso molecular)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – pureza analítica

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PCL – policaprolactona

PDI – *polydispersity index* (índice de polidispersividade)

PEG – polietilenoglicol

pH – potencial hidrogeniônico

PLA – poliácido láctico ou ácido poliláctico

PLGA – poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

PVA – poli (acetato de vinila)

RhB – rodamina B

rpm – rotações por minuto

Ser – serina

TGA – *thermogravimetric analysis* (análise termogravimétrica)

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Revisão bibliográfica	23
3.1 Biomateriais	23
3.2 A seda como biomaterial	25
3.3 Biomateriais particulados	28
3.4 Processos de obtenção de partículas	30
3.4.1 Aspersão em nitrogênio líquido.....	31
3.4.2 Precipitação em solventes orgânicos	31
3.4.3 Aspersão com o equipamento de Nano Spray Dryer.....	32
3.5 Nano e micropartículas de fibroína da seda	35
3.6 Liberação controlada de fármacos	37
4 Materiais e métodos	43
4.1 Materiais utilizados	43
4.2 Preparação da solução de fibroína da seda	43
4.3 Obtenção das partículas de fibroína	43
4.3.1 Aspersão em nitrogênio líquido.....	44
4.3.2 Precipitação em solventes orgânicos	44
4.3.3 Aspersão com o equipamento de Nano Spray Drying	44
4.4 Caracterização das partículas	45
4.4.1 Microscopia óptica	45
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
4.4.3 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	46
4.4.4 Termogravimetria (TGA)	46
4.4.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	46
4.4.6 Potencial Zeta	46
4.5 Modelos de eficiência de incorporação	47
4.6 Incorporação e liberação da doxorrubicina	49
4.7 Incorporação e liberação da zidovudina	50

5	Resultados e discussão	53
5.1	Obtenção das partículas de fibroína	53
5.1.1	Aspersão em nitrogênio líquido	53
5.1.2	Precipitação em solventes orgânicos	53
5.1.3	Aspersão com o equipamento de Nano Spray Drying	54
5.2	Caracterização das partículas	55
5.2.1	Microscopia óptica	55
5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
5.2.3	Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	60
5.2.4	Termogravimetria (TGA)	62
5.2.5	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	64
5.2.6	Potencial Zeta	67
5.3	Incorporação do fármaco/ativo	68
5.3.1	Modelos de eficiência de incorporação	68
5.3.2	Incorporação e liberação da doxorubicina	69
5.3.3	Incorporação e liberação da zidovudina	71
6.	Conclusões	75
7.	Etapas futuras	77
8.	Bibliografia	79

1. INTRODUÇÃO

A inclusão dos materiais na rotina do homem existe desde os primórdios da humanidade, quando a fabricação de ferramentas que otimizavam os processos diários e simplificavam a execução de diferentes atividades. Com a evolução do homem e das civilizações, foi introduzida a ciência dos materiais, que abrange diferentes áreas do conhecimento, desde a construção e a indústria até a medicina e a biologia; e é neste campo onde os chamados biomateriais adquiriram uma alta relevância [1].

Os biomateriais são utilizados em dispositivos médicos destinados a interagir com sistemas biológicos. A engenharia de tecidos, por sua vez, tem como objetivo desenvolver várias opções de tratamento para a produção, regeneração e substituição de material biológico perdido ou danificado através do uso de biomateriais [2].

Na procura por materiais com características adequadas à utilização biológica, materiais naturais e sintéticos têm sido estudados. A fibroína da seda, conhecida comercialmente por seda, é um polímero natural utilizado durante muito tempo na indústria têxtil e possui algumas vantagens em relação a outros materiais devido a sua larga produção em escala industrial. Além disso, já foram estabelecidos protocolos de purificação e remoção de sericina, outra proteína presente no fio da seda, que podem reduzir o risco de infecção em comparação a outros biomateriais. A fibroína da seda (FS) é uma proteína obtida a partir dos casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori* e que surge como um biomaterial de interesse devido as suas propriedades de biocompatibilidade, estabilidade térmica e biodegradabilidade [3].

Alguns estudos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, demonstraram que a FS é um material biocompatível capaz de desencadear menor resposta inflamatória em comparação a outros polímeros biodegradáveis comuns, tais como o colágeno. Outro atributo importante da FS é a sua processabilidade em diferentes formatos de material, tais como filmes, hidrogéis, nanofibras, nano ou micropartículas e *scaffolds* porosos ou esponjas. A capacidade de regular a estrutura e a morfologia das proteínas de seda num processo totalmente aquoso tornam este material um importante candidato para aplicações como suporte para liberação de fármacos. Além disso, foi observado que a taxa de degradação da FS pode ser ajustada controlando o estado

cristalino (conteúdo de folha β) durante o processamento para controlar o perfil de liberação de moléculas bioativas [4].

A liberação de moléculas bioativas e fármacos de forma controlada, lenta e duradoura são desejáveis para muitas aplicações. Nos últimos anos, muitos sistemas de liberação de fármacos foram desenvolvidos a partir de materiais diversos desde cerâmicas e metais até polímeros. Esses últimos tem a vantagem de poderem ser biodegradáveis, biocompatíveis e atingir um melhor encapsulamento. Entre os polímeros biodegradáveis sintéticos utilizados estão o ácido polilático (PLA) e o policaprolactana (PCL), e os polímeros naturais como a celulose, a quitosana, o ácido hialurônico, o alginato, além de proteínas como o colágeno, a elastina, a albumina e a fibroína da seda [5].

Seria vantajoso se o sistema de liberação de fármacos possuísse características biodegradáveis, biocompatíveis e mecanismos duráveis, e que pudesse ser preparado e processado sob condições aquosas ambientais para evitar a perda da bioatividade dos fármacos a serem administrados. Essas características e funcionalidades acrescentaram o interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em proteínas. Além disso, as proteínas possuem vários grupos funcionais que podem desencadear uma resposta biológica nas células e suas superfícies podem ser modificadas melhorando a sua adesão e eficiência [6, 7].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo objetiva o desenvolvimento de nano e micropartículas de fibroína da seda (FS) capazes de fazer a liberação controlada de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

Baseado no objetivo geral do presente estudo, os objetivos específicos são:

- Estabelecer um protocolo de obtenção de partículas de FS capaz de gerar partículas abaixo de 800 nm de diâmetro;
- Identificar o melhor método de obtenção de partículas de FS em relação à quantidade, tamanho de partícula e morfologia;
- Caracterizar as partículas quanto à sua morfologia, distribuição de tamanho e estrutura através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta;
- Avaliar a incorporação e liberação de princípios ativos ou fármacos nas micro e nanopartículas de FS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Traumas e doenças degenerativas geram a necessidade de substituições e reparos em diferentes partes do nosso corpo. Todos os materiais que recuperam ou ajudam a restaurar a funcionalidade de tecidos biológicos são chamados biomateriais. Uma primeira definição para este grupo de materiais os descreveu como "materiais inertes usados como instrumentos médicos, concebidos para interagir com qualquer sistema biológico". No entanto, o estudo desses materiais pelos diferentes campos da biologia, incluindo a engenharia tecidual, tem ampliado suas aplicabilidades, o que gerou uma demanda de até 1,5 milhão de dispositivos implantados ou em contato com sistemas biológicos a cada ano de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) [8].

A introdução de materiais não biológicos no corpo humano remonta aos tempos pré-históricos, quando egípcios utilizavam fibras naturais para suturas de feridas por volta de 3.000 A.C. Outras civilizações, como os fenícios também mostraram, seja por razões médicas ou cosméticas, substituições dentais de ouro e outros metais, que também foram feitos a partir de conchas pelos Maias por volta do ano de 600 A.C. A evidência também prova que o sucesso destes procedimentos foi baixo devido à falta de biocompatibilidade destes materiais e do escasso conhecimento no controle de infecções [9].

Ao longo dos anos, a investigação sobre as propriedades dos materiais e refinamento nas técnicas de implante resultou num progresso significativo no campo dos biomateriais. Dois dos maiores gatilhos de pesquisa em implantes médicos foram a Primeira e Segunda Guerra Mundial, onde principalmente os metais desempenharam papel importante. Após isso, vieram os biomateriais de segunda geração, por volta da década de 1970, que foram projetados para uma aplicação específica, por exemplo, em próteses dentárias, implantes mamários, enxertos vasculares, *stents* e válvulas cardíacas, e abriram o caminho para um relacionamento estreito entre Medicina e Engenharia. Atualmente, estamos na terceira geração de biomateriais, que são projetados especificamente para estimular uma resposta a nível celular e molecular, melhorando a integração e diminuindo qualquer reação adversa [2].

Alguns dos fatores importantes a serem considerados quando do desenvolvimento de um biomaterial envolvem toxicidade, biocompatibilidade, propriedades mecânicas e físicas, e a sua degradabilidade. Fundamentalmente, um biomaterial deve cumprir a sua função sem afetar ou causar danos a qualquer tecido do corpo, sendo atóxico no que se refere ao seu potencial alergênico, cancerígeno ou inflamatório. Por outro lado, a biocompatibilidade de um material é definida como a capacidade deste em executar a sua função com uma resposta apropriada pelo organismo hospedeiro. Por este motivo, todos os biomateriais são concebidos para evitar reações adversas tais como sangramento, colonização bacteriana e liberação de material particulado, entre outras. Devido aos esforços e cargas a que são submetidos os tecidos do nosso corpo, é importante que os biomateriais possuam comportamento mecânico adequado [10].

Biomateriais podem ser classificados de acordo com sua natureza em metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Cada um com aplicações e propriedades específicas. Os biomateriais metálicos incluem metais e suas ligas, e são usados principalmente para aplicações que precisam de alta carga, como implantes ortopédicos (fios, chapas, parafusos, próteses completas ou parciais) e aplicações dentárias [10]. Já os biomateriais cerâmicos compreendem uma outra classe de biomateriais que são geralmente caracterizadas pela sua dureza e fragilidade, o que limita a sua utilização para aplicações de suporte de carga. No entanto, possuem elevada resistência à compressão, são inertes e não produzem componentes prejudiciais para o organismo a menos que se destinem a serem reabsorvidos, evitando, assim, uma resposta desfavorável e levando a uma redução da citotoxicidade destes materiais [11].

Os biomateriais poliméricos começaram seu desenvolvimento após a segunda metade do século XX e surgiram como materiais ideais para um grande número de aplicações, entre elas as válvulas cardíacas, próteses mamárias, aplicações dentárias, lentes de contato e membranas de hemodiálise. Suas principais vantagens são a facilidade de fabricação e processamento, bem como a sua disponibilidade e baixo custo. Os polímeros podem ser divididos em dois grupos: naturais e sintéticos. Os polímeros sintéticos incluem acrílicos, poliamidas, poliésteres e poliuretanos que apesar de serem facilmente processados, possuem a grande desvantagem de ser pouco biocompatíveis. Esse problema pode ser resolvido com a

utilização de polímeros naturais, tais como quitosana, alginato e a seda, que têm sido utilizados em aplicações biomédicas e de engenharia tecidual [1, 12].

3.2 A seda como biomaterial

A origem da seda data do século XXVII A.C., na China, onde este material foi utilizado para a fabricação de tecidos de elevado valor e beleza. O advento da cultura da seda levou ao surgimento de novas aplicações, incluindo alguns exemplos na área médica. Algumas indicações mostram que entre os séculos XVIII e XIX, a seda começou a substituir cabos metálicos utilizados nas suturas cirúrgicas [13].

Figura 1. Bicho da seda *Bombyx mori*



Fonte: autoria própria.

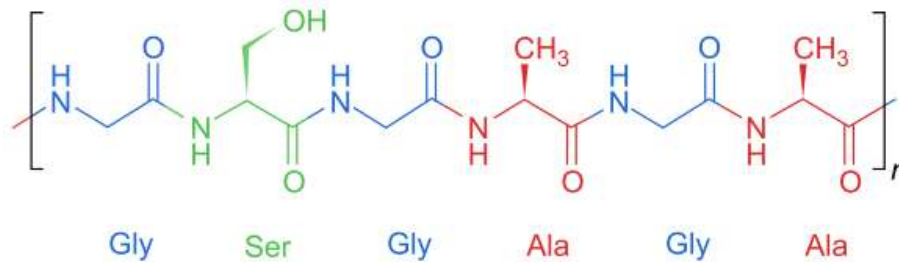
A seda é um polímero natural produzido em glândulas especializadas das células epiteliais e lúmen de artrópodes, como vermes, aranhas e alguns escorpiões, que é então secretado na forma de fibras para vários usos. O bicho da seda *Bombyx mori* (Figura 1) é um inseto lepidóptero e holometábolo que foi domesticado para o cultivo bem-sucedido de seda, principalmente na indústria têxtil. A lagarta possui glândulas secretoras de seda que usa para construir seu casulo, uma estrutura de proteção fechada onde começa sua metamorfose de lagarta a adulto. Um único bicho da seda pode produzir um fio contínuo de até 1.500 m. Apesar da fonte da seda exercer influência sobre a sua estrutura, composição e propriedades, as duas principais proteínas presentes na seda são a fibroína (fibrosa) e a sericina (globular) [14, 15].

A fibroína corresponde a aproximadamente 65 % da fibra da seda e está coberta por uma camada de sericina (restantes 35 %), que atua como uma cola solúvel em água em ebulição. A fibra possui entre 10 e 25 μm de diâmetro e é formada por duas cadeias de baixa massa molar (26-45 kDa) e uma de alta massa

molar (300-350 kDa) que estão presentes numa proporção de 1:1 e ligadas por ligações de dissulfeto simples. A fibroína é composta por ligações de dissulfeto entre a extremidade C-terminal (Cys-C20) de cadeia pesada e o C-terminal (Cys - 172) da cadeia leve, e uma glicoproteína de 25 kDa denominada P25 [16, 17].

A composição da fibroína de bicho da seda *Bombyx mori* consiste essencialmente de uma cadeia de quatro aminoácidos repetidos (Figura 2). São eles: a glicina (G, 43 %), a alanina (A, 30 %), a serina (S, 12 %) e a tirosina (Y, 9 %). A cadeia pesada tem 12 domínios que formam as regiões cristalinas das fibras, onde não há combinações repetidas destes aminoácidos (GAGAGS, GAGAGY, GAGAGA ou GAGYGA). Esta organização dá à FS a sua propriedade hidrofóbica e *design* de proteína polimérica [18].

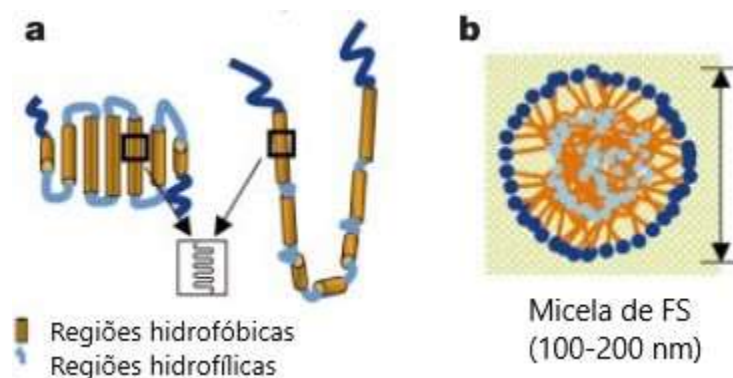
Figura 2. Estrutura da fibroína da seda (FS).



Fonte: adaptado [19].

A cadeia pesada da FS possui um padrão de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo que as regiões terminais são hidrofílicas, têm seis pequenas regiões internas hidrofílicas e sete regiões internas hidrofóbicas (Figura 3a). Esse padrão sugere a formação de micelas na água, devido a que as regiões hidrofílicas menores se mantêm hidratados durante a formação da estrutura, enquanto os terminais hidrofílicos da cadeia ficam nas bordas da micela (Figura 3b) [20]. A formação das estruturas micelares é altamente dependente de fatores como a concentração da proteína, o pH do meio, a temperatura e o tempo [21].

Figura 3. Estrutura da cadeia pesada da FS (a) e micela da FS (b).



Fonte: adaptado de [20].

Além de suas propriedades mecânicas, a fibroína da seda possui biocompatibilidade, dependendo da sua aplicação. Por exemplo, em aplicações dermatológicas, os filmes de fibroína ajudaram na regeneração do colágeno e na redução da resposta inflamatória, resultando em um tempo de cura menor. Especificamente em aplicações ósseas, verificou-se que os resíduos de aminoácidos presentes na superfície da seda permitem a captação de ligantes e fatores de crescimento que promovem a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos e fibroblastos [14, 18].

A taxa de degradação da FS é outra característica positiva que a qualifica como biomaterial. Altman *et al.* (2003) mostraram que a taxa de biodegradabilidade da FS é mais lenta do que a do colágeno, o que significa que o novo tecido regenerado apresenta melhor suporte estrutural no processo de formação [18]. Sabe-se também que as fibras de fibroína podem reter mais do que 50 % das suas propriedades mecânicas, mesmo após dois meses de implantação. Outros estudos também mostraram que a taxa de degradação da fibroína depende da estrutura, morfologia e condições mecânicas do local de implante, e é realizada principalmente por proteases e afetada por condições de pH e temperatura [17].

Devido as suas propriedades e elevada disponibilidade, a fibroína tem sido estudada para um grande número de aplicações. No campo biomédico, por exemplo, tem sido utilizada para transportar suportes, películas e revestimentos, e na regeneração de tecidos ósseo e dermatológico utilizando hidrogéis [22-26].

3.3 Biomateriais particulados

Nas últimas duas décadas, o estudo dos materiais em forma de partículas, geralmente na escala micro ou nanométrica, tem ganhado muito interesse devido a grandes variedades de aplicações biomédicas devido ao seu grande potencial, como na área de liberação de fármacos, biosensores, imagens diagnósticas, entre outras [12].

O termo “micropartículas” é utilizado quando se fala de uma dispersão de partículas ou partículas sólidas com um tamanho entre 1-1000 μm (1 μm equivale a 10^{-6} m); por outro lado, as “nanopartículas” estariam entre 1-1000 nm (1 nm equivale a 10^{-9} m) [27]. Porém a maioria das micropartículas e nanopartículas são menores que 100 μm e 500 nm, respectivamente. As diferenças de tamanho entre as micro e as nanopartículas provoca diferentes mudanças no comportamento que podem ter em um sistema biológico. No caso das nanopartículas, geralmente, apresentam melhor permeação através dos tecidos biológicos, porém também tem desvantagens como um tempo menor de permanência no tecido ou cavidade [27].

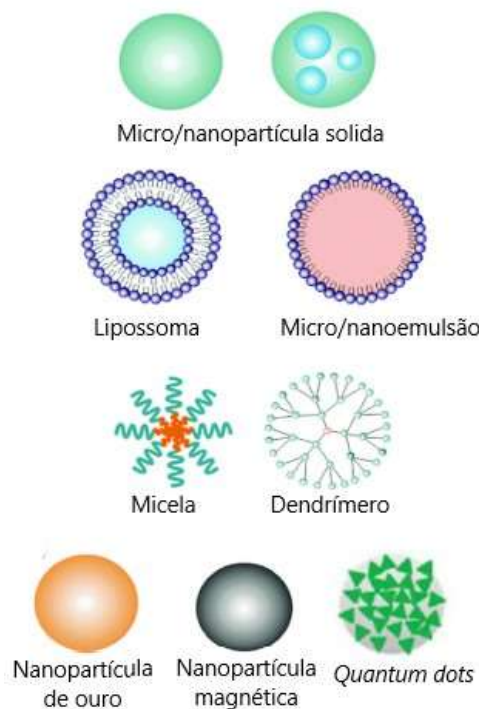
As quatro classes de biomateriais podem ser encontradas em diversas formas dependendo da aplicação a ser usada, incluindo as formas de micro e nanopartículas, como é o caso de partículas metálicas de ouro, prata ou titânio, geralmente menores que 50 nm [28]; partículas cerâmicas de zircônia e biovidros, geralmente usadas na área da Ortopedia e Odontologia [29]. Todos sistemas de micro/nanopartículas podem ser agrupados em três grandes grupos: partículas de fonte lipídica, partículas poliméricas e partículas inorgânicas (Figura 4), dentro desses grandes grupos destacam-se:

- Lipossomas: são vesículas, geralmente, com um núcleo aquoso formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos, como o colesterol, ou outros lípidos similares. Eles têm estruturas muito similares as membranas biológicas. Sua natureza permite-lhes transportar fármacos/ativos hidrofílicos dentro de seu núcleo aquoso e também hidrofílicos entre as camadas lipídicas [27].
- Micro ou nanoemulsões: comumente são emulsões que podem formar gotículas ou partículas com tamanho menor a 250 nm, elas exibem uma alta

flexibilidade e são estáveis termicamente. Tem alta relevância devido a seu relativo fácil preparo, boa permeabilidade na parede intestinal e fácil escalabilidade do processo de fabricação.

- Partículas inorgânicas: são aquelas sintetizadas a partir de metais e cerâmicas. Seu núcleo inorgânico vai influenciar propriedades de fluorescência, magnetismo ou condução elétrica ou propriedades óticas. Entre as mais conhecidas estão: os *quantum dots*, com um tamanho de entre 2-10 nm e feitos da combinação de elementos como o cádmio, chumbo ou zinco com o selênio, telúrio ou enxofre que têm uma excelente resistência a fotodegradação; as partículas ferromagnéticas, com tamanhos entre 10-50 nm que podem ser usadas como contraste de ressonância magnética ou em tratamentos de tumores por hipertermia; nanopartículas de ouro, níquel, platina ou titânio, com tamanhos que variam entre 3-200 nm, que podem adotar diversas morfologias e têm propriedades óticas e alta estabilidade.
- Micelas: com um tamanho entre 10 e 200 nm são dispersões coloidais com estruturas compostas de blocos anfifílicos de copolímeros na superfície e um núcleo de blocos hidrofóbicos. Essas estruturas podem ser formadas por diversos tipos de materiais poliméricos.
- Partículas com origem de polímeros sintéticos: podem ser sintetizadas a partir de polímeros biodegradáveis ou não biodegradáveis, entre as mais comuns estão: os dendrímeros formadas por um núcleo polimérico altamente ramificado com um diâmetro menor a 15 nm, e que tem sido usados para melhorar a solubilidade de fármacos, porém há estudos que mostram altos níveis de toxicidade e hemólise [30]. Os micro ou nano géis são estruturas compostas por ligações tridimensionais entre a rede de cadeias poliméricas, possuem alta estabilidade e tem uma penetração transdérmica efetiva.
- Partículas de polímeros naturais: dentre os vários polímeros naturais que são empregados na síntese de partículas estão a quitosana, o alginato, a albumina, a gelatina e a fibroína da seda. As propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e físico-químicas desses materiais fazem com que sejam muito atraentes para as aplicações na área da Biologia e Medicina.

Figura 4. Representação gráfica de diferentes tipos de materiais micro e nanoparticulados.

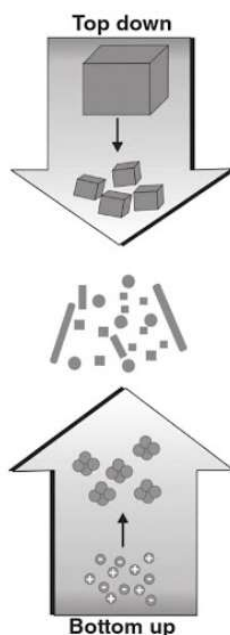


Fonte: adaptado de [27].

3.4 Processos de obtenção de partículas

A micro e a nano fabricação de partículas envolvem diversos processos e métodos que têm se desenvolvido rapidamente nas últimas décadas. Dado o grande número de aplicações, os métodos de obtenção são divididos em duas grandes categorias: *top-down* e *bottom-up* (Figura 5). O primeiro começa com um material em seu tamanho original que vai ser quebrado através de processos químicos, mecânicos, etc, até atingir dimensões na escala micro ou nanométrica. Normalmente, são processamentos mais antigos envolvem uma grande quantidade de energia e as partículas formadas têm tamanhos altamente heterogêneos. Por outro lado, os processos *bottom-up* usam componentes no nível atômico ou molecular para construir arranjos micro ou nanométricos mais complexos [12].

Figura 5. Esquemático dos processos *top-down* e *bottom-up* na produção de nanomateriais.



Fonte: adaptado de [31].

Os métodos de moagem e litografia ótica são exemplos de processos *top-down*, enquanto a deposição atômica, emulsificação, precipitação, auto montagem molecular (*molecular self-assembly*) são exemplos de processos *bottom-up* [32].

Neste trabalho, foi usada uma mistura das abordagens *top-down* e *bottom-up*, pois os fios de seda precisam ser tratados e a FS deve ser dissolvida até ser levada na sua forma de molecular em solução e as metodologias *bottom-up* de aspersão e precipitação em solventes orgânicos foram escolhidas para a formação das partículas.

3.4.1 Aspersão em nitrogênio líquido

A técnica visa usar um equipamento para formar gotículas pequenas de uma solução que vai ser borrifada diretamente em nitrogênio líquido, que está a uma temperatura aproximada de $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$. As gotículas vão ser congeladas rapidamente e podem ser recuperadas logo depois que o nitrogênio evaporar [33].

3.4.2 Precipitação em solventes orgânicos

A adição de solventes orgânicos como etanol, metanol ou acetona numa solução aquosa para a formação de partículas visa a rápida desidratação do material.

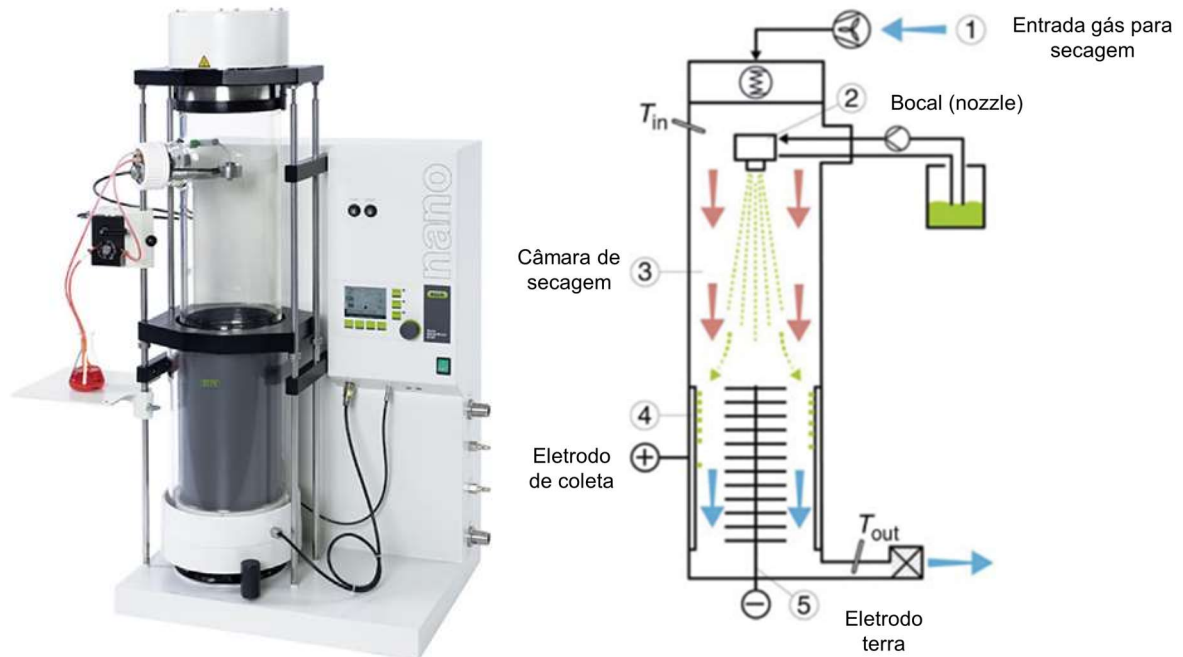
Comumente, o processo precisa de uma quantidade muito maior de solvente e envolve agitação magnética. No caso das proteínas, o contato com o solvente orgânico vai gerar uma mudança na conformação da estrutura e um aumento na cristalinidade da mesma [34]. Entre as limitações da técnica está o controle do tamanho e uniformidade das partículas, o que vai depender também de condições do equipamento de gotejo da solução no solvente orgânico. Além disso, devido a toxicidade do solvente o processo envolve uma etapa posterior de purificação e remoção do mesmo.

Dreis *et al.* (2007), usaram a técnica de precipitação em solventes orgânicos para obter nanopartículas de albumina de soro humano. No trabalho, 2 mL da solução de albumina foram gotejados em 8 mL de etanol a uma velocidade de 1 mL min⁻¹. Além disso, foi incorporado gluteraldeído como agente reticulante. As partículas foram centrifugadas e ressuspensas em água. O diâmetro das partículas variou entre 150 e 500 nm [35]. Recentemente, Jahanban *et al.* (2016), otimizaram o método de síntese de partículas similares, obtendo amostras com um tamanho de 100 nm e um índice de polidispersividade menor. A troca do sistema de adição da solução no solvente e a mudança do agente reticulante, fez com que as partículas obtidas tivessem um tamanho menor e fossem mais uniformes, isso demonstrou que o método é altamente dependente da forma em que a solução entra em contato com o solvente, incluindo o equipamento usado e a velocidade [36].

3.4.3 Aspersão com o equipamento de *Nano Spray Dryer*

É uma técnica usada para a obtenção de partículas a partir da secagem de uma solução. A utilização, mais especificamente, do equipamento Nano Spray Dryer B-90 da empresa suíça Büchi (Figura 6), no mercado desde o 2009, envolve parâmetros como o tamanho da membrana, temperatura e fluxo de ar para obter diferentes tipos de partículas. As membranas permutáveis de aço inoxidável possuem orifícios com diâmetros de 4; 5,5 e 7 µm.

Figura 6. Equipamento de *Nano Spray Dryer B-90* (direita) e esquema de funcionamento geral.

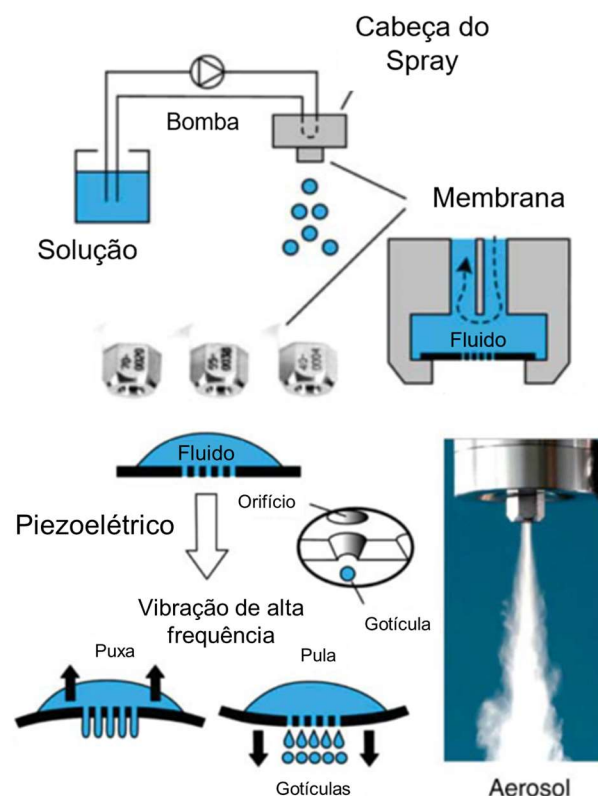


Fonte: adaptado de [37]

O mecanismo de funcionamento (Figura 7) começa com a solução localizada no reservatório conectada a cabeça do *spray* por tubos plásticos. Uma bomba peristáltica faz o fluido circular uniformemente desde o reservatório até a cabeça e de volta ao reservatório. Essa circulação permite uma atomização contínua e eficiente. Logo, os cristais piezelétricos alocados no bocal vibram a uma frequência ultrassônica aproximada de 60 kHz, gerando o movimento cíclico para cima e para baixo da membrana. Conseqüentemente a solução localizada sobre a membrana vai ser forçada a passar pelos orifícios, que devido a rápida deformação da membrana atuam como bombas, formando pequenas gotículas e gerando um aerossol. Essas gotículas carregadas atravessam a câmara de secagem com uma velocidade que varia dependendo do fluxo de ar entre 80 e 160 L min⁻¹.

Milhões de gotículas são criadas por segundo, o tamanho final das partículas vai depender do orifício da membrana e das propriedades físico-químicas do material como a viscosidade e a tensão superficial. Fluidos muito viscosos podem ter uma geração de gotículas intermitente ou até criar entupimento da membrana. Os parâmetros como o fluxo do *spray* e a temperatura devem ser levados em consideração para a otimização do processo de secagem [38].

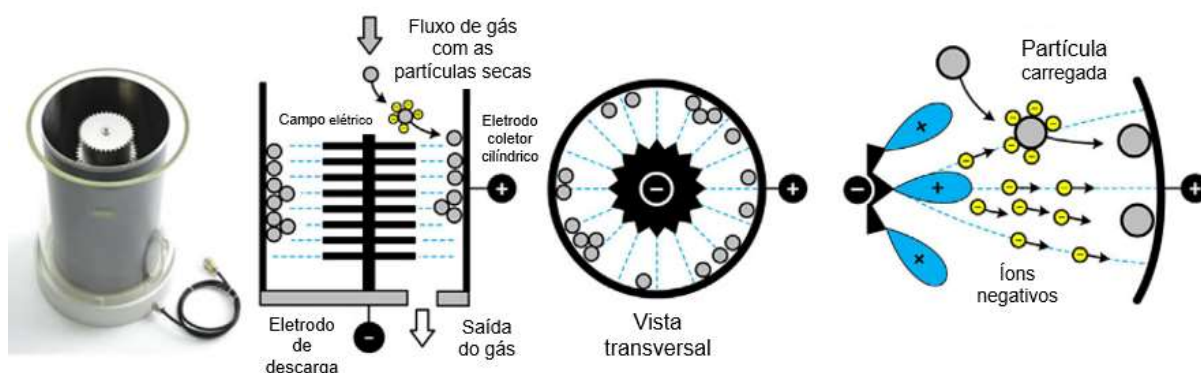
Figura 7. Esquema do processo de geração de gotículas no *Nano Spray Dryer*.



Fonte: adaptado de [37]

O sistema coletor de partículas (Figura 8) está baseado no princípio de carregamento eletrostático, que é a diferença em relação a outros equipamentos que usam ciclones, assim atua em todas as partículas independentemente da massa. Começa com a geração de um campo elétrico de 15 kV entre o eletrodo coletor cilíndrico metálico e o eletrodo de descarga. Com o aumento do potencial elétrico, íons negativos no gás de secagem começam ser formados e vão carregar as partículas que estão descendo da câmara de secagem. Essa carga faz com que as partículas sejam desviadas do fluxo de ar até o eletrodo coletor cilíndrico, onde a carga é dissipada e estas se aglomeram até ser coletadas [37]

Figura 8. Esquema do sistema coletor de partículas do *Nano Spray Dryer*.



Fonte: adaptado de [37]

A secagem com o equipamento de *Nano Spray Dryer* tem sido aplicada a diferentes formulações que incluem aplicações na área de alimentos, cosmética e farmacêutica [39, 40]. Lee *et al.* (2011), obtiveram nanopartículas esféricas de albumina de soro bovino com um diâmetro médio de 460 nm, foi usada uma membrana de 4 μm , um fluxo de ar de 150 L min^{-1} e uma temperatura de entrada de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ [39]. Oliveira *et al.* (2013) conseguiram otimizar a encapsulação de vitamina B12 em diferentes matrizes de origem natural e sintética e avaliaram a influência no tamanho das partículas de propriedades como a viscosidade e a tensão superficial da solução antes da secagem [41]. Schultz *et al.* (2016), conseguiram encapsular o fator de crescimento IGF-I secando uma solução de FS obtendo partículas esféricas com um tamanho entre $0,25 - 3,15 \mu\text{m}$ [42].

3.5 Nano e micropartículas de fibroína da seda

Vários métodos de preparação de partículas de FS têm sido estudados nos últimos anos. Entre eles estão a dessolvatação, o *salting out*, a moagem mecânica, o *electrospraying*, entre outras. Cada um deles pode possuir diferentes vantagens e desvantagens, na dependência da aplicação final. A fabricação de nanopartículas de FS para o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos continua sendo um desafio e requer maiores investigações devido a fatores como tamanho da partícula e geometria, que ainda não foram totalmente controlados [5, 43].

Zhang *et al.* (2007) descreveram a síntese de nanopartículas de FS através da mistura de FS aquosa e de solventes orgânicos miscíveis em água (metanol, etanol, propanol e isopropanol) ou solventes polares aprotônicos (acetona). No

processo, as moléculas de FS mudaram instantaneamente da estrutura de seda I (amorfa) para a seda II (alto conteúdo de folha β) e os autores conseguiram obter partículas insolúveis em água com estrutura *beta* de tamanho de partícula entre 35 e 125 nm de diâmetro [44].

Cao *et al.* (2007) prepararam microesferas de FS com um tamanho previsível e controlável entre 200 e 500 nm adicionando uma pequena quantidade de etanol à fibroína de seda regenerada e levando-a a abaixo do ponto de congelamento. O tamanho das partículas foi controlado dependendo da quantidade de etanol adicionado e da temperatura ou velocidade de congelamento [45].

Com o método de *salting out*, a adição de sais numa solução permite que os domínios hidrofóbicos das proteínas interajam com as moléculas de água e formem ligações de hidrogênio. Conseqüentemente as moléculas da proteína agregam-se, formando interações hidrofóbicas entre si e precipitam na solução. Lammel *et al.* (2010) descreveram a síntese de partículas de FS com tamanho entre 486 e 1200 nm em um processo totalmente aquoso com o método de *salting out* usando fosfato de potássio. As partículas obtidas foram refrigeradas por duas horas e coletadas por centrifugação. O tamanho das partículas mudou dependendo do pH da solução do fosfato de potássio [43].

A técnica de *electrospraying* objetiva a atomização usando forças elétricas normalmente de uma solução líquida que é forçada a fluir para fora de um capilar mantido num potencial elétrico elevado, fazendo com que um material seja disperso em gotas pequenas. Qu *et al.* (2014) obtiveram nanopartículas de FS com diâmetros variáveis entre 59 e 75 nm usando essa técnica. A solução borrifada pelo equipamento foi coletada em um banho de nitrogênio líquido e logo depois foi liofilizada. O estudo procurou obter uma alternativa no tratamento com fármacos terapêuticos para alguns tipos de câncer [46]. Outros estudos realizados por Li *et al.* (2018) e Huang *et al.* (2017) têm utilizado o congelamento em nitrogênio líquido da solução de FS para a rápida formação de hidrogéis e filmes para crescimento celular, porém ainda existem dúvidas sobre a otimização desse método para a formação de partículas com tamanho uniforme e sem precisar de um equipamento adicional [47, 48].

Muitos outros métodos de obtenção de partículas de FS têm sido estudados e desenvolvidos nos últimos anos, porém algumas limitações dos métodos são a

agregação de partículas, a presença de resíduos de sais ou agentes orgânicos, o alto custo do equipamento, ou os tamanhos irregulares das partículas obtidos por alguns métodos [38, 49, 50]. Assim, a produção de micro e nanopartículas de FS está focada em maior parte para uso na liberação controlada de fármacos.

3.6 Liberação controlada de fármacos

Um sistema de liberação controlada de fármacos tem como objetivo controlar temporal e espacialmente a concentração de fármacos para maximizar os benefícios e minimizar os seus efeitos adversos. O composto bioativo administrado pode ser dissolvido, dispersado ou encapsulado em um material biocompatível chamado veículo. Os materiais portadores de fármaco têm uma alta relevância na liberação deste e podem ser processados em diferentes sistemas como nanopartículas, microesferas, microcápsulas, pílulas ou emulsões [5].

Por suas propriedades e versatilidade, uma atenção especial tem sido dada aos biomateriais poliméricos e sua capacidade de liberação de fármacos. Nano e micropartículas possuem características únicas devido ao seu tamanho, mostrando vantagens na proteção da degradação do fármaco, além de melhorar a estabilidade biológica, a absorção, o tempo de retenção, a penetração intracelular e diminuindo os riscos de toxicidade. Os biomateriais poliméricos naturais apresentam uma ótima biocompatibilidade, biodegradabilidade e função antimicrobiana. Além disso, existem vários grupos funcionais que podem melhorar a resposta biológica nas células [51].

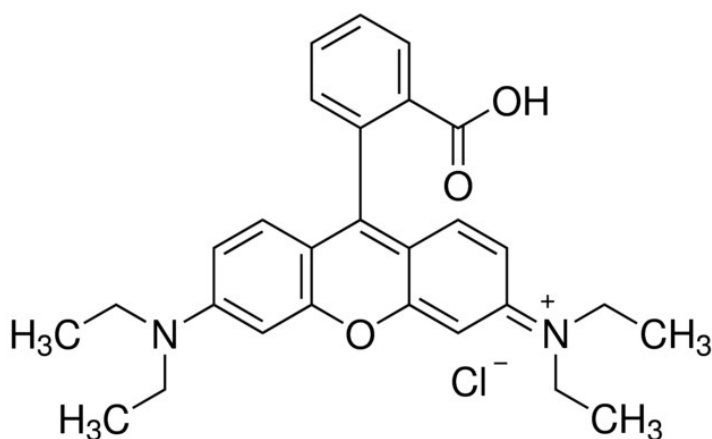
Os sistemas de liberação controlada de fármacos baseados em biomateriais poliméricos de origem proteica apresentam a vantagem de conseguir mudar a superfície da proteína, melhorando a sua eficiência. Além disso, são biocompatíveis, biodegradáveis e em muitos casos mostram uma arquitetura e propriedades físicas e químicas semelhantes à matriz extracelular, exibindo assim propriedades bioativas únicas e de interesse na engenharia tecidual [52].

No planejamento de estudos de liberação controlada de fármacos muitos fatores devem ser levados em consideração, dentre eles a interação do micro ou nanocarregador ou nanoveículo com moléculas, o custo dos ensaios e a disponibilidade comercial do fármaco. Por esse motivo, pesquisas em diversas áreas têm usado substâncias como modelos de incorporação, visando testar o

comportamento do material [53, 54]. A rodamina B (RhB) e o cristal violeta (CV) foram escolhidos neste estudo como modelos de incorporação nas partículas de FS.

A RhB (MM 479 Da) é conhecida por ser um corante solúvel em água, etanol e metanol que imita o comportamento de fármacos, e devido ao fato de que seu máximo de absorção é em 540 nm, sendo possível utilizar a espectroscopia no UV-visível e ainda com um máximo de emissão entre 560-580 nm e usar-se a microscopia de fluorescência para sua quantificação [55, 56]. A sua estrutura molecular é mostrada na Figura 9. Wang *et al.* (2010), usaram rodamina B e tetrametilrodamina conjugada com albumina de soro bovino como modelo para estudar a incorporação de micro e nanoesferas compostas de FS e polivinil álcool (PVA). Eles encontraram que o contato do material com o corante não mostrou mudanças estruturais nas partículas e tiveram uma porcentagem de incorporação aproximadamente de 95 %(massa/massa) [57]

Figura 9. Estrutura molecular da rodamina B.



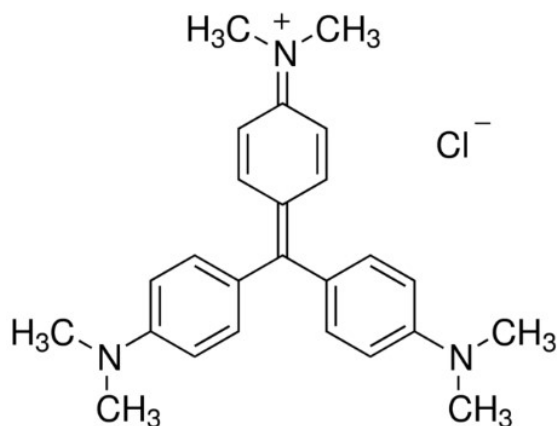
Fonte: adaptado de [58]

O CV (MM 408 Da) também conhecido como violeta genciana, é um corante usado em diversos processos relacionados com a identificação de bactérias pelo método de coloração de Gram e coloração de células [59]. Além disso, conta com propriedades antissépticas e antimicóticas sendo usado no tratamento de lesões e queimaduras. A sua estrutura molecular é mostrada na Figura 10.

Lammel *et al.* (2010), usou CV para carregar partículas de FS sintetizadas pelo método de *salting out* em fosfato de potássio. Obtendo uma eficiência de

incorporação superior ao 95% do corante, justificado nas interações carga-carga das partículas de FS com carga negativa e as moléculas de CV com carga positiva.

Figura 10. Estrutura molecular do cristal violeta.

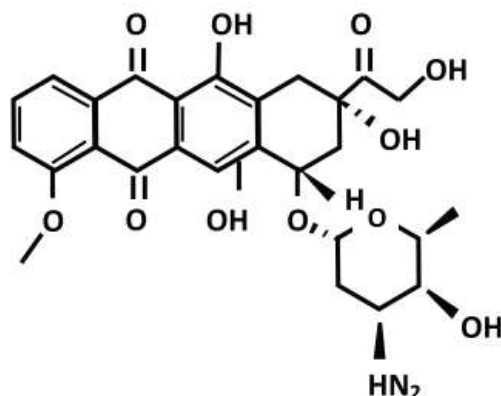


Fonte: adaptado de [60]

O uso de micro e nanocarregadores de fármacos no tratamento de doenças como o câncer e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem especial relevância devido a que uma liberação controlada dos ativos terapêuticos diminuiria o impacto e desgaste dos pacientes no tratamento, assim como sintomas associados com as sessões de quimioterapia constantes, como vômito e diarreia. Nesse estudo foram escolhidos a doxorrubicina (DOX) e a zidovudina (AZT) como fármacos para testar a incorporação e liberação nas partículas de FS.

A doxorrubicina (Figura 11) é um quimioterápico da família das antraciclina (fármacos extraídos a partir de cultivos de *Streptomyces*) altamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da topoisomerase tipo II, uma enzima necessária na divisão e crescimento de células cancerosas [61].

Figura 11. Estrutura molecular da doxorubicina.



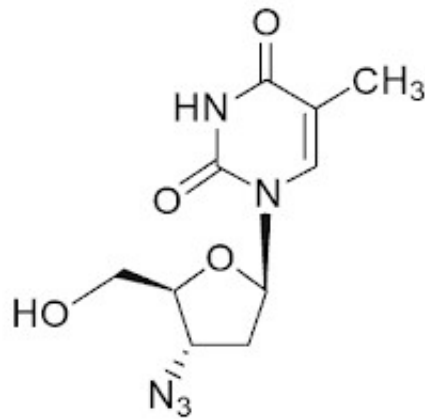
Fonte: adaptado de [63].

Normalmente sua administração é por via intravenosa, mas também pode ser administrado por via intravesical (especialmente no caso do câncer de bexiga) [62]. Seu uso clínico está restringido devido à toxicidade associada com a dose, com efeitos secundários que incluem mielosupressão (diminuição da atividade da medula óssea) e cardiotoxicidade (comprometimento da mobilidade do coração) [63].

Zhang *et al.* (2016), conseguiram carregar partículas de polietilenoglicol (PEG) com DOX e outro fármaco, sintetizando as partículas a um pH 7,4 junto com uma solução de DOX. Os estudos de incorporação em células tumorais mostraram uma maior atividade do fármaco e também uma maior acumulação das partículas no tumor levando a um aumento na penetração tumoral [64].

A zidovudina, ou azidotimidina, (Figura 12) é um antirretroviral altamente usado no tratamento e na prevenção da infecção do vírus de imunodeficiência adquirida (HIV). O mecanismo de ação envolve a inibição da replicação dos retrovírus, atuando durante a etapa de transcrição. O tratamento melhora a função imune e outras anomalias clínicas associadas à AIDS. Além disso reverte parcialmente a disfunção neurológica associada à infecção do HIV. Porém, altas doses podem causar efeitos tóxicos para os pacientes comprometendo a saúde da medula óssea, gerando anemia e leucopenia (redução no número de leucócitos no sangue) [65, 66].

Figura 12. Estrutura molecular da zidovudina.



Fonte: adaptado de [67].

Prasad *et al.* (2014) sintetizaram nanopartículas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e Tween 80 carregadas com AZT obtendo eficiências de incorporação entre 28-57 % com uma liberação por volta de 50-85 %. Estudos de estabilidade mostraram que o fármaco não foi degradado durante 90 dias sob condições de refrigeração [68].

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

Casulos de seda limpos classe I do bicho da seda *Bombyx mori* foram fornecidos pela empresa de Fiação de Seda BRATAC (Bastos, SP, Brasil); carbonato de sódio, Dinâmica química contemporânea Ltda.; cloreto de cálcio, Panreac; álcool etílico desnaturizado 40B, J. T. Baker; metanol, Merck; polissorbato 80 (Tween 80), Mapric; polissorbato 20 (Tween 20), Mapric; rodamina B, Carlo Erba; cristal violeta, Merck; doxorrubicina, Sigma-Aldrich; zidovudina; cloreto de sódio, Merck; cloreto de potássio, Merck; ácido fosfórico, Mallinckrodt; água desionizada. Todos os reagentes e solventes usados foram de grau PA.

4.2 Preparação da solução de fibroína da seda

Para a remoção da sericina, proteína que recobre a fibroína no casulo da seda, utilizou-se uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e água desionizada na proporção 1:100 massa/volume, onde 10 g dos casulos de seda foram submersos nesta solução por 60 min à temperatura da ebulição da água. Após esse tratamento, foram feitas três lavagens das fibras com água desionizada a temperatura ambiente, seguido de secagem em estufa a 60 °C por 24 h.

Para a solubilização das fibras, uma solução ternária com cloreto de cálcio (CaCl_2), etanol absoluto e água desionizada foi preparada na proporção de 1:2:8. As fibras de fibroína foram gradualmente adicionadas à solução a uma temperatura de 55 °C por 60 min. A solução de fibroína foi, então, dialisada em tubos de diálise (MWCO 3500 Da) contra água desionizada com constante agitação. Trocou-se a água da diálise a cada 4 h por um período de 72 h. A concentração final obtida foi de aproximadamente 5 % massa/volume e a solução foi armazenada a 4 °C por até um mês.

4.3 Obtenção das partículas de fibroína

Após determinar a concentração de fibroína na solução, a obtenção das partículas foi testada por meio de três diferentes métodos:

4.3.1 Aspersão em nitrogênio líquido

Utilizou-se um equipamento simples de aspersão usado comercialmente para borrifar a solução. Foi usado 1 L de nitrogênio líquido (aproximadamente $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), congelando as partículas no momento do borrifamento. Foram borrifados 10 mL de solução de fibroína 5 % massa/volume a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Procurou-se otimizar o método através da padronização da distância (0,1 m) e do ângulo (45 graus) em relação ao recipiente com nitrogênio líquido. Após a evaporação do nitrogênio líquido, as partículas foram liofilizadas por 24 h (Edwards Freeze Dryer MODULYO) de acordo com o protocolo descrito por Yoshioka *et al* [69].

4.3.2 Precipitação em solventes orgânicos

Inicialmente as partículas de fibroína foram obtidas usando um borrifador convencional, comumente utilizado em soluções cosméticas, para o borrifamento de 10 mL de solução de fibroína 5% massa/volume em 500 mL de solventes miscíveis em água, como etanol (amostra nEtOH1) e metanol (amostra nMeOH) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a obtenção, as suspensões foram centrifugadas (HITACHI HIMAC CR 20B2) por 15 min a 8000 rpm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram ressuspensas em água desionizada.

Após a otimização do método e verificação da estabilidade das partículas em suspensão, foi utilizado o dispositivo LMA[®] MAD Nasal[™] de atomização (*TeleFlex Medical*, USA) no laboratório do Departamento de Bioengenharia da *McGill University* (Montreal, Canadá) para o borrifamento de 10 mL de solução de fibroína 5 % massa/volume em 500 mL de etanol a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (amostra nEtOH2).

4.3.3 Aspersão com o equipamento de *Nano Spray Drying*

Foram feitos testes de secagem da solução de fibroína com as concentrações mostradas na Tabela 1. Foram usados Tween 80 e Tween 20 como agentes surfactantes. Foi usado o equipamento de *Nano Spray Dryer* (BUCHI B90) do Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas (LPP) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, São Paulo). Os parâmetros iniciais de secagem (para as amostras SF5, SF1, SF075, SF05, SF025, SF025T80, SF025T20, SF025SC) foram: membrana de porosidade de $5,5\text{ }\mu\text{m}$, temperatura de entrada de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de saída de $54\text{ }^{\circ}\text{C}$, atomização da membrana piezoelétrica a 100 %, temperatura do bico a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão a 40 mbar e fluxo de gás de 130 L min^{-1} .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Após a otimização do método os parâmetros utilizados (para as amostras SF1T20, SF1T20AZT) foram: membrana de porosidade de 4,0 μm , temperatura de entrada de 90 °C, temperatura de saída de 54 °C, atomização da membrana piezoelétrica a 100 %, temperatura do bico a 90 °C, pressão a 40 mbar e fluxo de gás de 140 L min^{-1} .

Tabela 1. Concentrações teste pelo método de *Nano Spray Drying*

Amostra	Concentração FS [%massa/volume]	Concentração Tween 80 [%] *	Concentração Tween 20 [%] *	Ativo/fármaco
SF5	5	0	0	Nenhum
SF1	1	0	0	Nenhum
SF075	0,75	0	0	Nenhum
SF05	0,5	0	0	Nenhum
SF025	0,25	0	0	Nenhum
SF025T80	0,25	0,5	0	Nenhum
SF025T20	0,25	0	0,5	Nenhum
SF1T20	1	0	0,05	Nenhum
SF1T20AZT	1	0	0,05	Zidovudina

*Percentagens em relação à massa de FS.

4.4 Caracterização das partículas

4.4.1 Microscopia óptica

As amostras obtidas pelo método de aspersão foram analisadas em microscópio óptico Primo Star acoplado a uma câmera digital, com aumentos de 10 e 100 vezes para a análise da morfologia. Para medir o tamanho médio das partículas foi utilizado o *software* UTHSCSA *Image Tool* versão 3,0.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias por MEV foram obtidas com o objetivo de determinar a morfologia da superfície e o tamanho das partículas a partir de amostras colocadas em *stubs* (suportes) de alumínio e recobertas com uma camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$. Foi utilizado o equipamento ZEISS LEO 440 (LEO

Electron Microscopy Ltda) com detector OXFORD (Modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV do Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil).

4.4.3 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Foi utilizada a espectroscopia FT-IR para determinar as mudanças na estrutura das partículas de fibroína da seda. Os espectros das amostras foram feitos em pastilhas de $\text{KBr}_{(s)}$, previamente secas e de grau PA. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro FT-IR Shimadzu IRAffinity – 1 do Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil), na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 *scans*.

4.4.4 Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada no Laboratório de Análise Química, Eletroanalítica e Química de Soluções (Lateqs) do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil) pela Dra. Ana Paula Garcia Ferreira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro; a fim de verificar as propriedades térmicas da fibroína, assim como sua estrutura. As medidas foram realizadas de 25 a $800 \text{ }^\circ\text{C}$, em atmosfera de ar sintético, com amostras de aproximadamente 10 mg em um equipamento da *TA Instruments*, modelo Q50, com a taxa de aquecimento de $10^\circ \text{ C min}^{-1}$.

4.4.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Foi feita a medição do tamanho de partículas de FS ressupensas em água desionizada, utilizando o equipamento de DLS Zetasizer Nano-ZS da Malvern Instruments (Worcestershire, England) do Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil) a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e um índice de refração de 1,60 em triplicata nos dias 1 e 28 após a obtenção.

4.4.6 Potencial Zeta

A medição do potencial Zeta serviu para determinar a estabilidade das partículas dentro de uma solução, assim como sua interação eletrostática e sua afinidade ou repulsão em uma suspensão. Foi realizado usando um equipamento ZetaPlus / BI-PALSDLS (BrookHaven Instrument Corp, USA) do Laboratório de

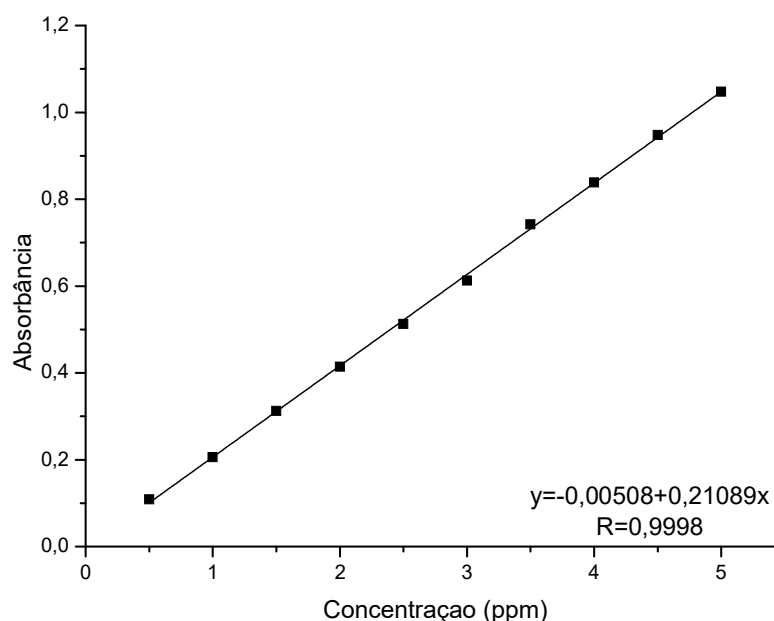
4. MATERIAIS E MÉTODOS

NanoQAM da Universidade de Quebec sob responsabilidade do Prof. Dr. Joseph Matt Kinsella em Montreal (Montreal, Canadá) a uma temperatura de 25 °C e um índice de refração de 1,60 em triplicata.

4.5 Modelos de eficiência de incorporação

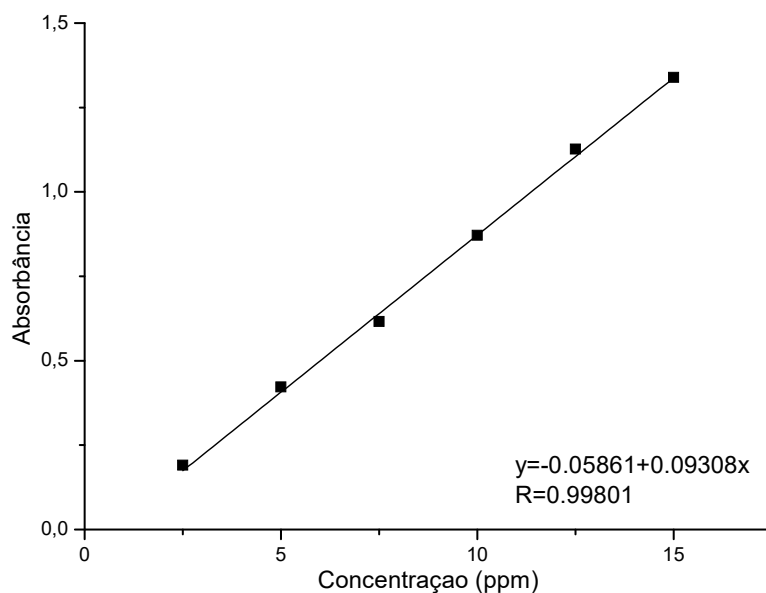
Com o objetivo de verificar se as partículas obtidas pelos diferentes métodos conseguiram ser consideradas como carregadores ou veículos, foram testados dois corantes a rodamina B (RhB) e o cristal violeta (CV). Para a curva de calibração da RhB (Figura 13) foram usadas concentrações de 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5 mg mL⁻¹ obtidas por diluição de uma solução de 10 mg mL⁻¹ preparada com rodamina B em água desionizada a 25° C. A quantificação do corante foi feita por espectrofotometria de ultravioleta, utilizando-se um espectrofotômetro (HITACHI U-3000) do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil). com lâmpada de tungstênio-halogênio. Utilizou-se o comprimento de onda de 554 nm de acordo com a metodologia empregada por Lammel *et al.* [43].

Figura 13. Curva de calibração para a rodamina B no comprimento de onda de 554 nm.



Da mesma forma, foi feita a curva de calibração para o CV (Figura 14) com concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; e 15 mg mL⁻¹. Utilizou-se o comprimento de onda 577 nm para a leitura.

Figura 14. Curva de calibração para o cristal violeta no comprimento de onda de 577 nm.



Os testes de eficiência de incorporação foram feitos com 500 μL das amostras de partículas obtidas por precipitação em nEtOH1 adicionadas a 4,5 mL de solução do corante, em triplicata. No caso da RhB foi utilizada uma concentração de 3 mg mL^{-1} e para o CV foi utilizada a concentração de 10 mg mL^{-1} . Três tempos de incorporação de 15 min, 6 h e 24 h foram selecionados. Após a incorporação, as amostras foram centrifugadas (HITACHI HIMAC CR 20B2) por 15 min a 8000 rpm a 25 $^{\circ}\text{C}$. A eficiência de incorporação foi medida com a concentração absorvida pelas nanopartículas através de método indireto, ou seja, medindo-se a absorbância no sobrenadante e usando a Equação 1. Em todos os casos usou-se um branco sem nanopartículas incorporadas para a comparação.

$$EC = \frac{C_i - C_{sn}}{C_i} * 100 \quad (1)$$

Onde:

EC= Eficiência de incorporação.

C_i = Concentração do corante antes da incorporação.

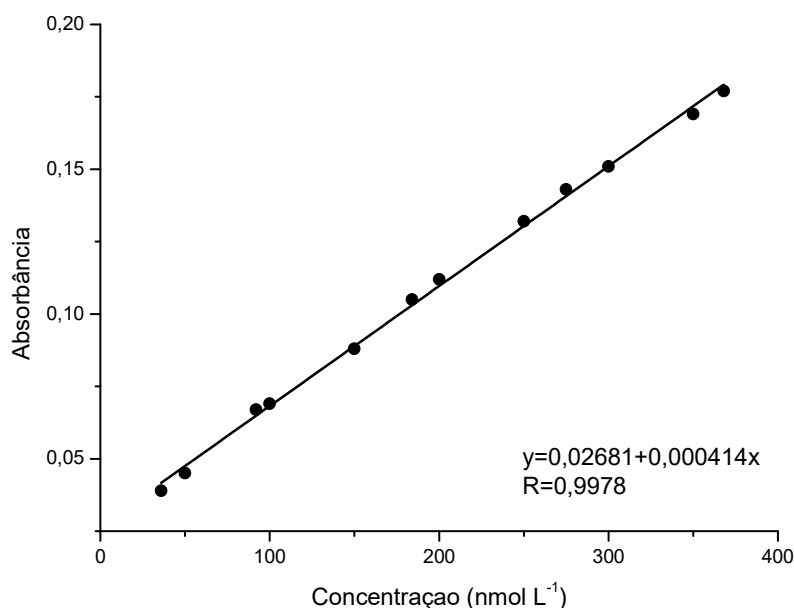
C_{sn} = Concentração do corante no sobrenadante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.6 Incorporação e liberação da doxorubicina

A doxorubicina (DOX), um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia para diversos tipos de câncer, foi escolhido para o estudo de incorporação e liberação. Para a curva de calibração da doxorubicina (Figura 15) foram usadas concentrações de 36; 50; 92; 100; 150; 184; 150; 184; 200; 250; 275; 300; 350 e 368 nmol L⁻¹ obtidas por diluição de uma solução estoque de 8,6 μmol L⁻¹ preparada com doxorubicina e água desionizada. A quantificação do fármaco foi realizada por espectrofotometria de ultravioleta, utilizando-se um espectrofotômetro (HITACHI U- 3000) do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil). com lâmpada de tungstênio-halogênio. Utilizou-se o comprimento de onda de 480 nm de acordo com a metodologia descrita por Tian *et al.* [50].

Figura 15. Curva de calibração para a doxorubicina no comprimento de onda de 480 nm.



Os testes de eficiência de incorporação foram feitos com 50 μL da amostra de nanopartículas obtidas por precipitação em nEtOH2 adicionadas a 200 μL de solução de DOX com uma concentração de 50 μg mL⁻¹ ou 184 nmol L⁻¹, em triplicata. Quatro tempos de incorporação de 30 min, 2 h, 6 h e 24 h foram selecionados. Após a incorporação, as amostras foram centrifugadas (HITACHI HIMAC CR 20B2) por 15 min a 8000 rpm a 25 °C. A eficiência de incorporação foi determinada medindo a absorbância no sobrenadante e a Equação 1 e ainda se usou um branco sem nanopartículas incorporadas para a comparação.

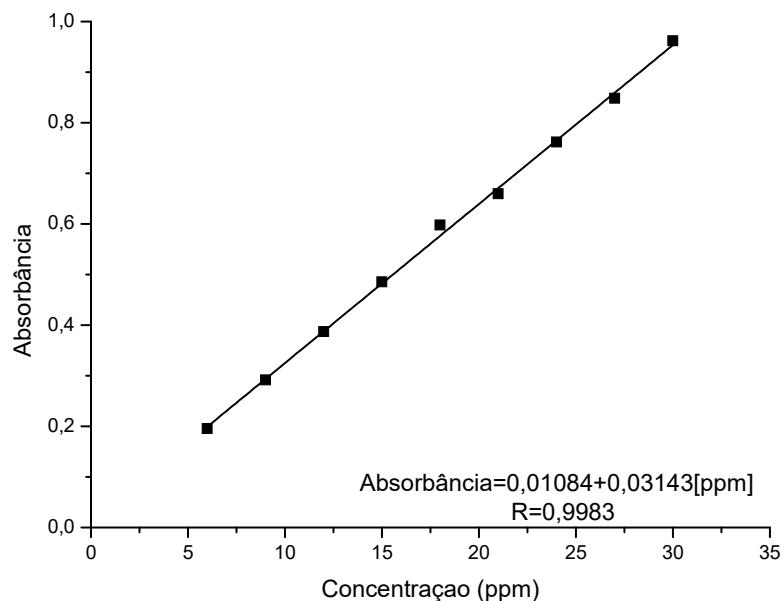
Para os estudos de liberação da DOX foram usados 50 μL da amostra de nanopartículas obtidas por precipitação em $n\text{EtOH}_2$ com uma concentração de 0,5 mg mL^{-1} adicionadas a 200 μL de solução de DOX com uma concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em triplicata. Após um tempo de incubação de 2 h, as amostras foram centrifugadas (HITACHI HIMAC CR 20B2) por 15 min a 8000 rpm e a 25 °C. Os pellets foram dispersos em 5 mL de três soluções de tampão fosfato (pH 5,0; 7,4 e 9,0) e colocados em sacos de diálise (MWCO 3500 Da). Os sacos foram colocados em 600 mL da respectiva solução tampão, com agitação e mantidos a uma temperatura de 37 °C por 24 h. Em intervalos determinados de tempo, foram coletados 1 mL da solução tampão e foi analisada sua absorbância no comprimento de onda de 480 nm. Para manter um volume constante, 1 mL fresco de tampão foi adicionado após a retirada de cada amostra.

4.7 Incorporação e liberação da zidovudina

A zidovudina (AZT) é um antirretroviral usado no tratamento de pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida e também com o complexo relacionado com a síndrome de imunodeficiência adquirida, causados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foi escolhido para o estudo de incorporação e liberação. Para a curva de calibração da zidovudina (Figura 16) foram usadas concentrações de 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27; 30 e 36 mg mL^{-1} obtidas por diluição de uma solução de 36 mg mL^{-1} preparada com zidovudina e água desionizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 16. Curva de calibração para a zidovudina (AZT) no comprimento de onda de 266 nm.



A quantificação do fármaco foi feita por espectrofotometria de ultravioleta, utilizando-se um espectrofotômetro (HITACHI U-3000) do Instituto de Química de São Carlos (São Carlos, Brasil) com lâmpada de deutério e utilizou-se o comprimento de onda de 266 nm.

Os testes de eficiência de incorporação foram feitos com 2,5 mL da amostra de partículas obtidas por precipitação em nEtOH2 e por secagem no *Nano Spray Dryer* adicionadas a 2,5 mL de solução de AZT, em triplicata. Três tempos de incorporação de 30 min, 6 h e 24 h foram selecionados. Após a incorporação, as amostras foram centrifugadas (HITACHI HIMAC CR 20B2) por 15 min a 8000 rpm a 25 °C e a eficiência de incorporação foi determinada como descrito para DOX.

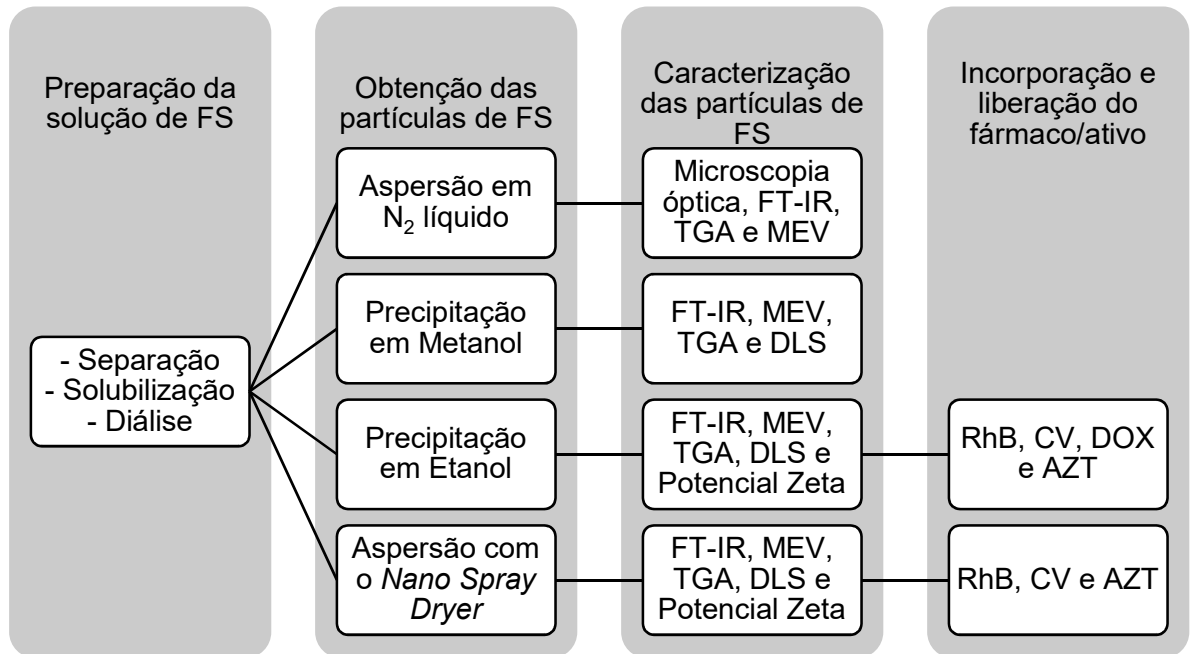
Para os estudos de liberação da AZT foram usados 2,5 mL da amostra de partículas obtidas por secagem no *Nano Spray Dryer* (SF1T20) e por precipitação em EtOH (nEtOH2) com uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹ adicionadas a 2,5 mL de solução de AZT com uma concentração de 0,136 mg mL⁻¹, em triplicata. Também foi avaliada a liberação do AZT da amostra SF1T20AZT, onde foram adicionados 2,5 mL de AZT a 25 mL da solução de FS previamente a secagem no *Nano Spray Dryer*. Após um tempo de incubação de 2 h, as amostras foram centrifugadas (HITACHI HIMAC CR 20B2) por 15 min a 8000 rpm e a 25 °C. Os pellets foram dispersos em 1 mL de solução de tampão fosfato (pH 7,4) e colocados em sacos de diálise (MWCO 3500 Da). Os sacos foram colocados em 25 mL da respectiva solução

tampão, com agitação e mantidos a uma temperatura de 37 °C por 24 h. Em intervalos determinados de tempo, foram coletados 3 mL da solução tampão e foi analisada sua absorbância no comprimento de onda de 266 nm. A amostra retirada do PBS foi colocada de volta para manter um volume constante.

Na Figura 17 foram esquematizados todos os processos realizados, especificando como as etapas de preparação da solução da FS, os quatro diferentes métodos de obtenção avaliados e suas respectivas caracterizações, assim como os modelos e fármacos incorporados e/ou liberados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 17. Esquema métodos de obtenção, caracterização, incorporação e liberação das partículas.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das partículas de fibroína

Foram preparadas partículas de FS por três metodologias distintas: aspersão em nitrogênio líquido, precipitação em solventes orgânicos e aspersão usando o equipamento de *Nano Spray Drying*. Os resultados são apresentados a seguir.

5.1.1 Aspersão em nitrogênio líquido

Foram obtidas partículas com uma coloração branca e de diversos tamanhos, conforme mostrado na Figura 18. O método apresentou limitações na formação de partículas uniformes e a formação de aglomerados na superfície do nitrogênio líquido. Após a evaporação do nitrogênio e a liofilização das partículas, observou-se uma textura esponjosa nas partículas maiores.

Figura 18. Partículas de FS obtidas por aspersão.

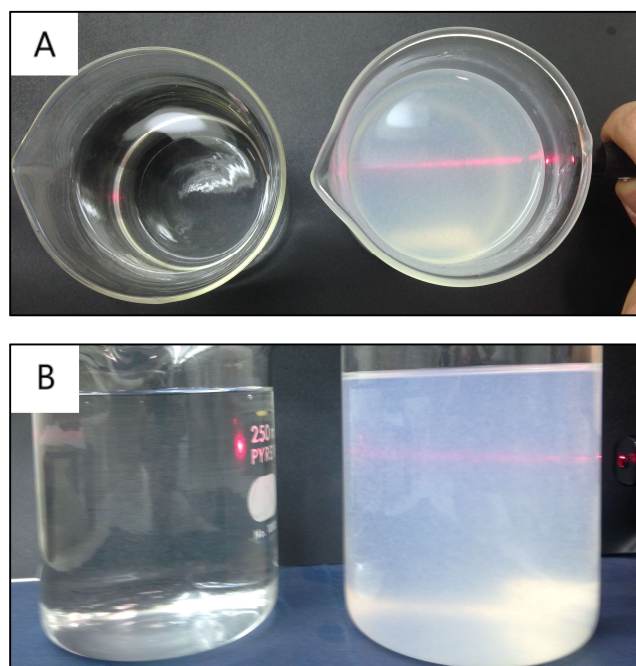


5.1.2 Precipitação em solventes orgânicos

As partículas obtidas pelo método de precipitação em solventes orgânicos mostraram a formação de uma suspensão coloidal onde foi possível observar o chamado efeito Tyndall, como reportado em outros estudos [70, 71]. Na Figura 19, constatou-se esse efeito com a comparação entre água deionizada e as suspensões também em água deionizada das amostras de nEtOH1 e de nMeOH. Foi possível

observar que o feixe de luz emitido por um laser é espalhado em ambas as suspensões, evidenciando a presença de partículas que atuam como fontes luminosas secundárias [72]. A suspensão obtida da amostra nEtOH2 mostrou o mesmo comportamento quando submetida ao feixe de luz.

Figura 19. Efeito Tyndall nas amostras nEtOH1 (A) e nMeOH(B).



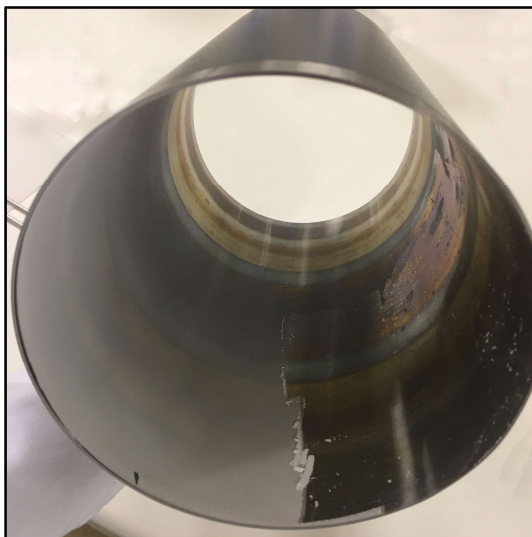
Após a formação da suspensão, as partículas foram armazenadas e observou-se a presença de precipitados. Por este motivo, as suspensões foram colocadas em um banho ultrassônico de 15 min, a fim de se ressuspender as partículas antes das suas caracterizações.

5.1.3 Aspersão com o equipamento de *Nano Spray Drying*

As amostras SF5, SF1, SF075, SF05 e SF025 foram testadas no equipamento sem sucesso durante a secagem. Logo no início, observou-se a obstrução (entupimento) da membrana em todos os casos. Mesmo após a utilização de uma membrana de 5,5 μm , o problema persistiu. Baseados, então, nas experiências de Lee *et al.* [39], diminuiu-se a concentração da solução de FS e os Tween 80 e Tween 20 foram utilizados como surfactantes com o objetivo de diminuir a tensão superficial da solução e evitar o entupimento. Porém as amostras testadas (SF025T80, SF025T20) não mostraram melhores resultados durante a secagem.

A otimização do método de secagem foi alcançada mudando os parâmetros de temperatura de entrada e fluxo de gás do equipamento de *Nano Spray Dryer*, de 120 °C para 90 °C e de 130 L min⁻¹ para 140 L min⁻¹, respectivamente. Com esses parâmetros a secagem da amostra SF1T20, com uma membrana de 4 µm, foi bem-sucedida. Conseguindo coletar as partículas no eletrodo cilíndrico (Figura 20) e permitindo-se obter por volta de 3,5 ± 0,3 mg de partículas por cada mL de solução. A secagem da amostra SF1T20AZT foi realizada com os mesmos parâmetros e teve uma eficiência de secagem de 2,9 ± 0,4 mg por mL de solução.

Figura 20. Partículas da amostra SF1T20 sendo coletadas do eletrodo cilíndrico do equipamento de *Nano Spray Dryer*. (vista transversal)

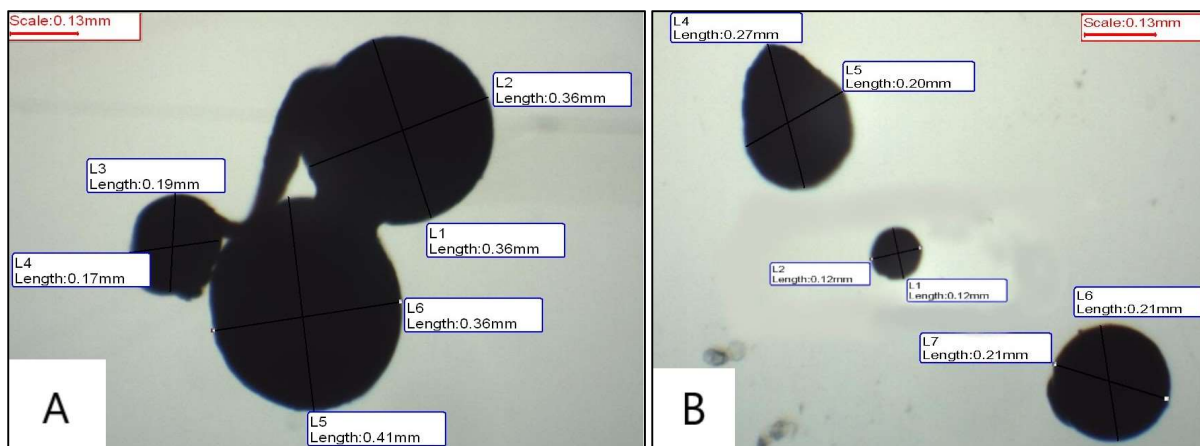


5.2 Caracterização das partículas

5.2.1 Microscopia óptica

As imagens das partículas obtidas pelo método de aspersion em nitrogênio líquido (Figura 21) mostraram ser de diferentes formatos, desde achatadas e ovaladas até algumas com alta esfericidade. Os tamanhos também foram variáveis, encontrando-se entre 120 e 500 µm de diâmetro. Observou-se a presença de aglomerados, de forma que partículas menores se encontravam dispostas ao redor das partículas maiores.

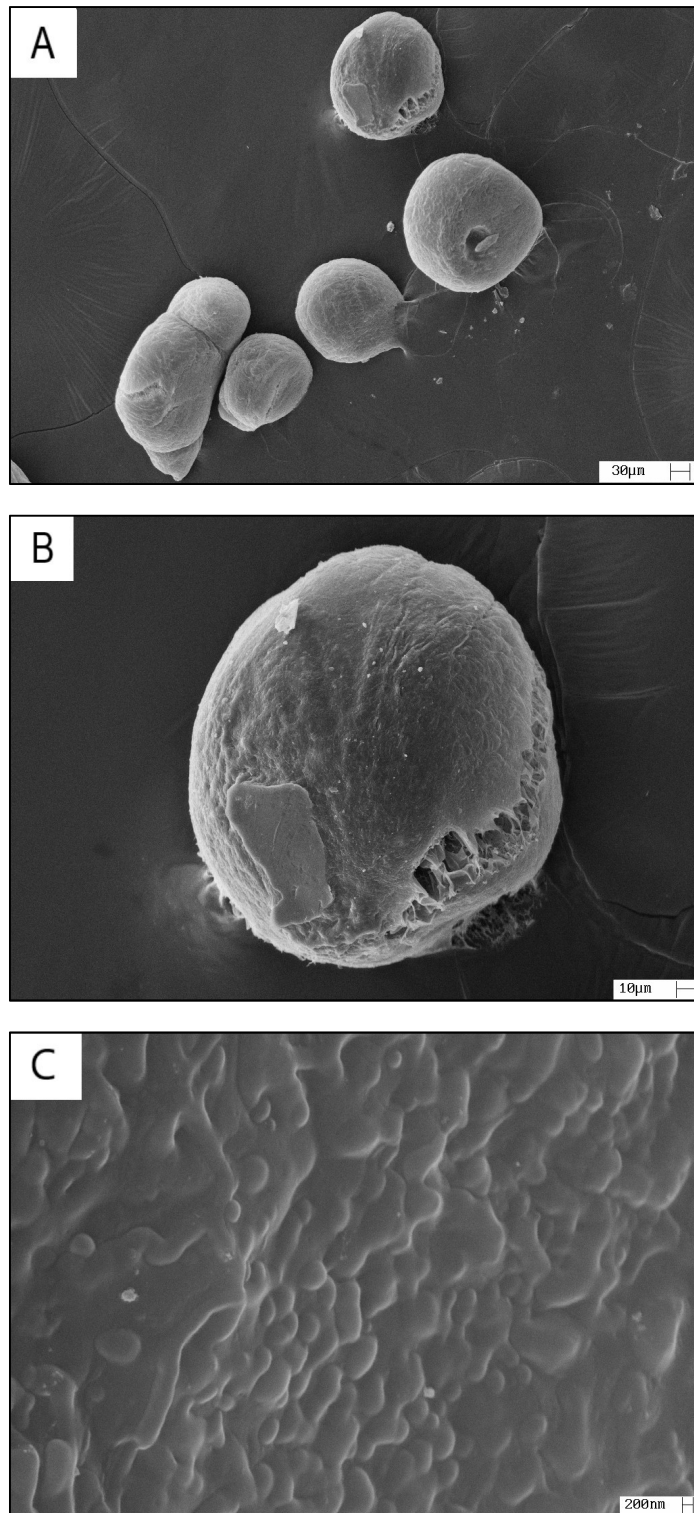
Figura 21. Microscopia óptica de partículas de FS obtidas por aspersão em nitrogênio líquido aumentadas 10X (A) e 100X (B).



5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas fotomicrográficas da Figura 22 foi possível observar a morfologia das micropartículas obtidas pelo método de aspersão em nitrogênio líquido. Novamente, foi possível observar os aglomerados onde partículas menores estão quase fusionadas às partículas maiores (Figura 22A). As partículas apresentaram morfologias variadas como pseudoesféricas ou ovaladas e tamanhos por volta de 130 μm (Figura 22B). A superfície das partículas apresentou-se irregular com regiões rugosas compostas por camadas de proteína sobrepostas (Figura 22C), além de alguns defeitos que expõem parte do interior da partícula. A formação de tais defeitos é atribuída ao método de obtenção, onde a formação das partículas e seu congelamento ocorrem em um tempo muito curto, impedindo a formação de uma superfície uniforme [73].

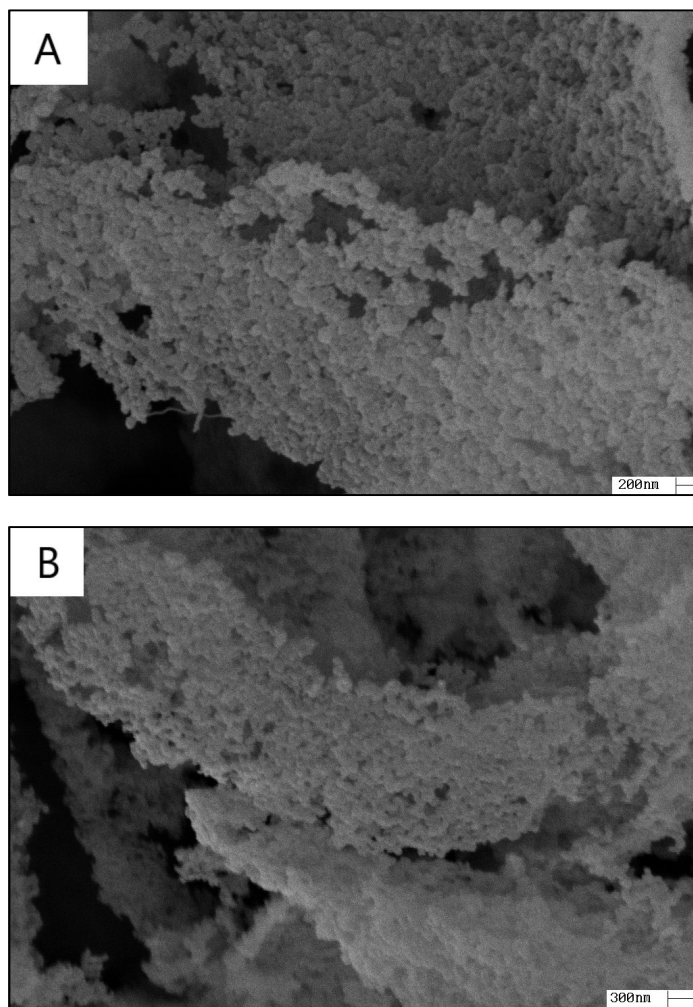
Figura 22. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas por aspersão com aumentos de 350X (A); 1200X (B) e 30000X (C).



As imagens de MEV na Figura 23 mostram as partículas obtidas pelo método de precipitação em solventes orgânicos. Ambas as amostras, nEtOH (Figura 23A) e nMeOH (Figura 23B), apresentaram estruturas esféricas aglomeradas em

planos bidimensionais. Foram obtidas partículas uniformes de tamanhos similares e diâmetros menores que 200 nm, o que permite afirmar que o método de precipitação em solventes orgânicos produz nanopartículas de FS.

Figura 23. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas pelo método de precipitação em nEtOH (A) e nMeOH (B) com aumentos de 50000X.



Nas Figuras 24 e 25 são apresentadas as fotomicrografias por MEV das amostras SF1T20 e SF1T20AZT obtidas no equipamento de *Nano Spray Dryer* com um aumento de 10000X (Figura 24A e 25A) e de 25000X (Figura 24B e 25B). Foi observado que a grande maioria das partículas apresentaram morfologia esférica, com tamanhos muito diferentes que variaram entre diâmetros de 300 nm a 2 μ m, aproximadamente. A morfologia das partículas obtidas é similar à de outros estudos que usaram o equipamento de *Nano Spray Dryer* [74], partículas esféricas são esperadas devido a que essa é a forma mais estável da gotícula logo depois de sair da cabeça do spray, compactando a solução e dando um acabamento homogêneo na

partícula final. Nas condições de secagem e soluções de FS utilizadas, não se obtiveram partículas ocas, irregulares ou com poros.

Figura 24. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas da amostra SF1T20 secas no *Nano Spray Dryer* com aumentos (A) 10000X (B) e 25000X.

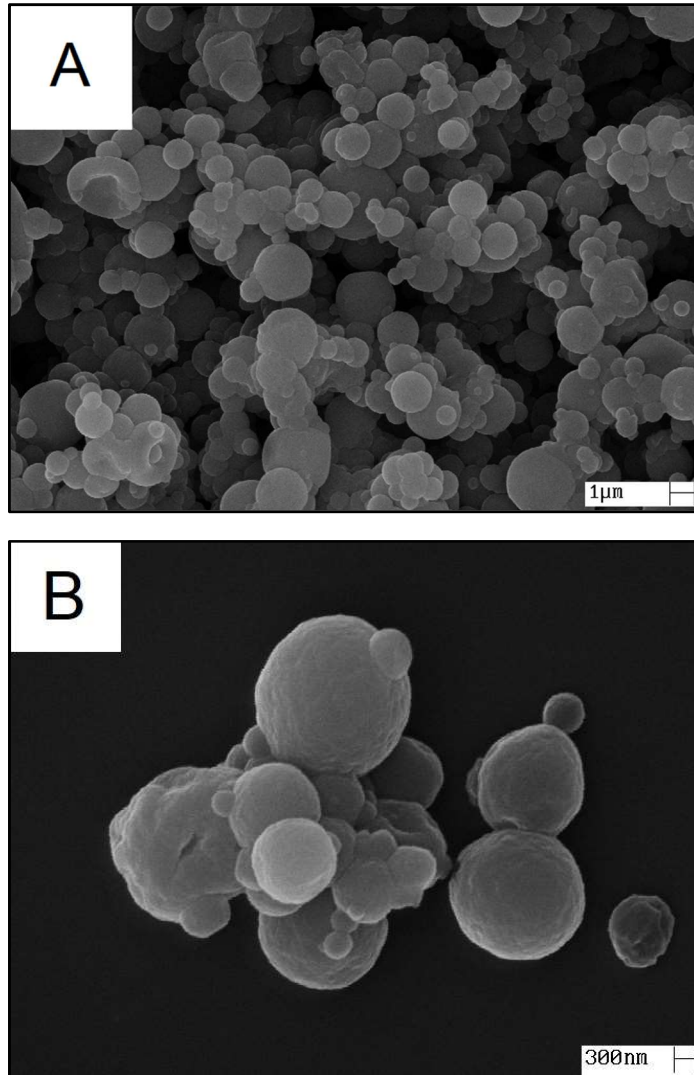
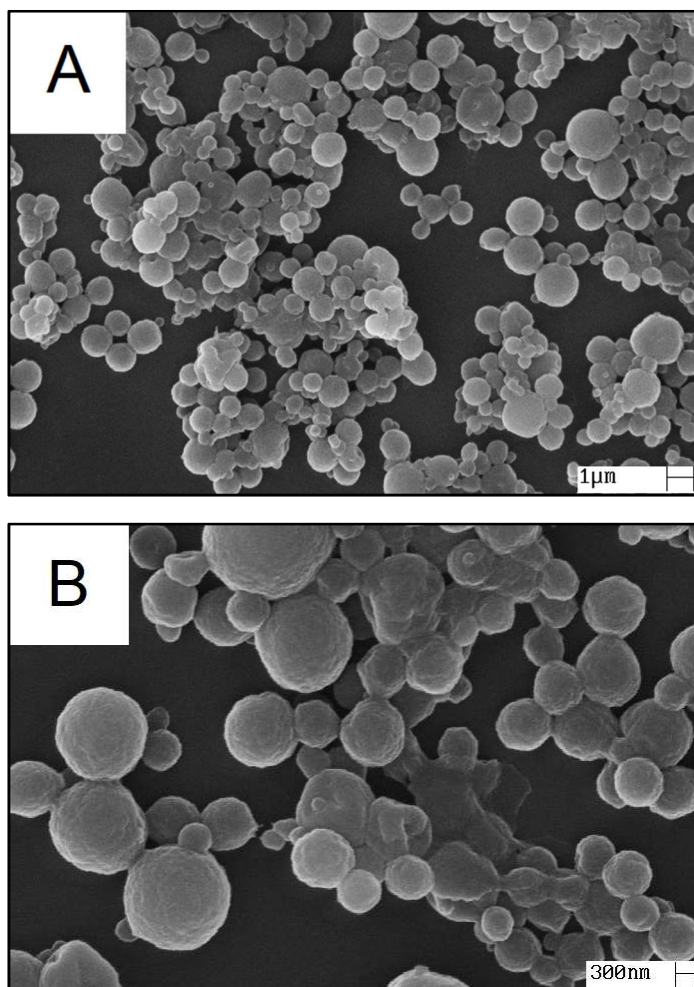


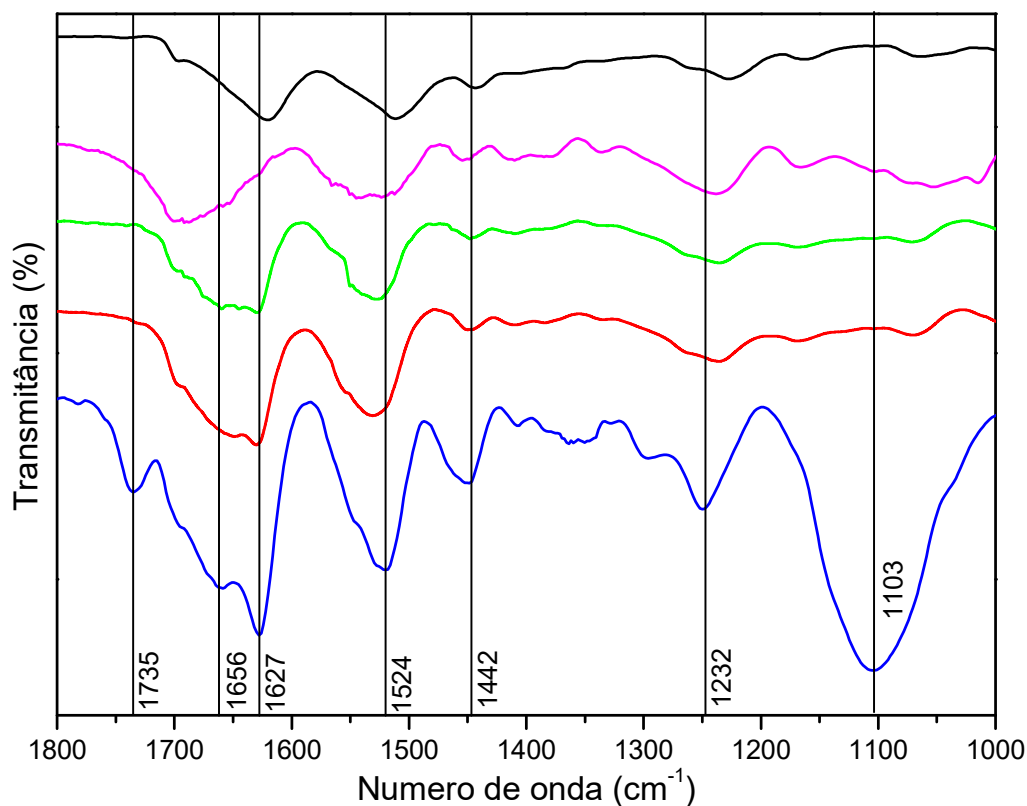
Figura 25. Fotomicrografias por MEV das partículas obtidas da amostra SF1T20AZT secas no Nano Spray Dryer com aumentos (A) 10000X (B) e 25000X.



5.2.3 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros na Figura 26 correspondem às amostras obtidas pelos três métodos descritos juntamente com o espectro da fibra de FS antes de ser dissolvida. A análise das mudanças estruturais da FS foi evidenciada para a região da amida I (estiramento C=O, $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$), a amida II (dobramento N – H e dobramento C – N, $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) e a amida III (dobramento N – H e estiramento C – N, $1190 - 1280 \text{ cm}^{-1}$) [75]. A Tabela 2 mostra as bandas vibracionais e sua correspondência com a FS.

Figura 26. Espectros no FT-IR das partículas obtidas por aspersão em nitrogênio líquido (—), precipitação em metanol (—), precipitação em etanol (—), aspersão no *Nano Spray Dryer* (—) e a fibra de FS antes de ser dissolvida (—).



A banda em 1524 cm^{-1} , correspondente a amida II, esteve presente em todos os espectros, assim como a banda em 1232 cm^{-1} , que corresponde a amida III com conformações randômicas e amorfas características da estrutura determinada seda I (amorfa). Para as amostras obtidas por precipitação em solventes orgânicos, tanto em etanol quanto em metanol, a estrutura predominante é de seda II já que apresentam estruturas de folha β como mostrada pela presença de bandas em 1627 cm^{-1} (amida I) e 1523 cm^{-1} (amida II). Essa estrutura esteve presente também no espectro da amostra SF1T20, que também contou com duas bandas em 1103 e 1735 cm^{-1} características do Tween 20, surfactante usado na formulação. A amida I em 1656 cm^{-1} corresponde as estruturas randômicas e de α hélice, presente nas amostras das partículas obtidas por aspersão tanto em nitrogênio líquido quanto no equipamento de *Nano Spray Dryer*. O espectro das micropartículas obtidas por aspersão mostrou bandas em torno dos 1680 cm^{-1} (amida I) e 1523 cm^{-1} (amida II) ou seda I, com conformações randômicas e amorfas. Foi possível observar que o método de obtenção influenciou a formação de estruturas de folha β , conseguindo uma maior

presença das mesmas nas nanopartículas precipitadas em solventes orgânicos e na amostra SF1T20, o que está em concordância com o efeito induzido já citado na literatura, onde a exposição da proteína a mudanças de temperatura e solventes orgânicos gera uma mudança da estrutura secundária, em alguns casos aumentando a cristalinidade [42, 45, 76].

Tabela 2. Bandas vibracionais presentes nos espectros no FT-IR das amostras obtidas.

Banda (cm ⁻¹)	Atribuição para a FS	Fibra	Micro	nMeOH	nEtOH	SF1T20
1735	Grupo carbonila R-CO-O-R Tween 20 [77]					X
1680	Seda I [78]		X			
1656	Amida I em conformações randômicas e de α hélice [75]		X			X
1627	Amida I em conformação de folha β [75]			X	X	X
1524	Amida II [79]	X	X	X	X	X
1442	Dobramento CH ₃ -CH ₃ [75]			X		X
1242	Amida III [79]	X	X	X	X	X
1103	Estiramento do grupo CH ₂ -O-CH ₂ Tween 20 [77]					X

5.2.4 Termogravimetria (TGA)

Na Figura 27 e na Tabela 3 são apresentadas os resultados das análises termogravimétricas das partículas obtidas pelos métodos de aspersão em nitrogênio líquido (Micro), precipitação em etanol (nEtOH) e aspersão no equipamento de *Nano Spray Dryer* (SF1T20). Além disso, é apresentada a curva da fibra de FS antes de ser dissolvida (Fibra).

Inicialmente, as curvas das amostras Micro e Fibra mostraram perda de massa entre 25 e 280 °C, atribuída à desidratação que corresponde a 10,1 % e 5,9 %, respectivamente. Assim a amostra Micro apresenta maior retenção de água, a qual pode estar relacionada com o rápido processo de obtenção das partículas e congelamento de água dentro das mesmas. Em uma segunda fase nas duas amostras

é possível observar que a degradação está associada ao rompimento das ligações peptídicas e à quebra das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos [73, 80], mostrando para a amostra Fibra um T_{onset} de 286 °C. Na amostra Micro o T_{onset} ocorre em 276 °C e entre 315 – 425 °C, é possível observar uma região correspondente à degradação da proteína associada ao conteúdo de estrutura de folha β [81]. Finalmente, a degradação dos compostos e carbonização ocorre até 650 °C, deixando menos do 1 % da massa como resíduo em ambos casos.

Tabela 3. Etapas de variação de temperaturas nas amostras de partículas obtidas.

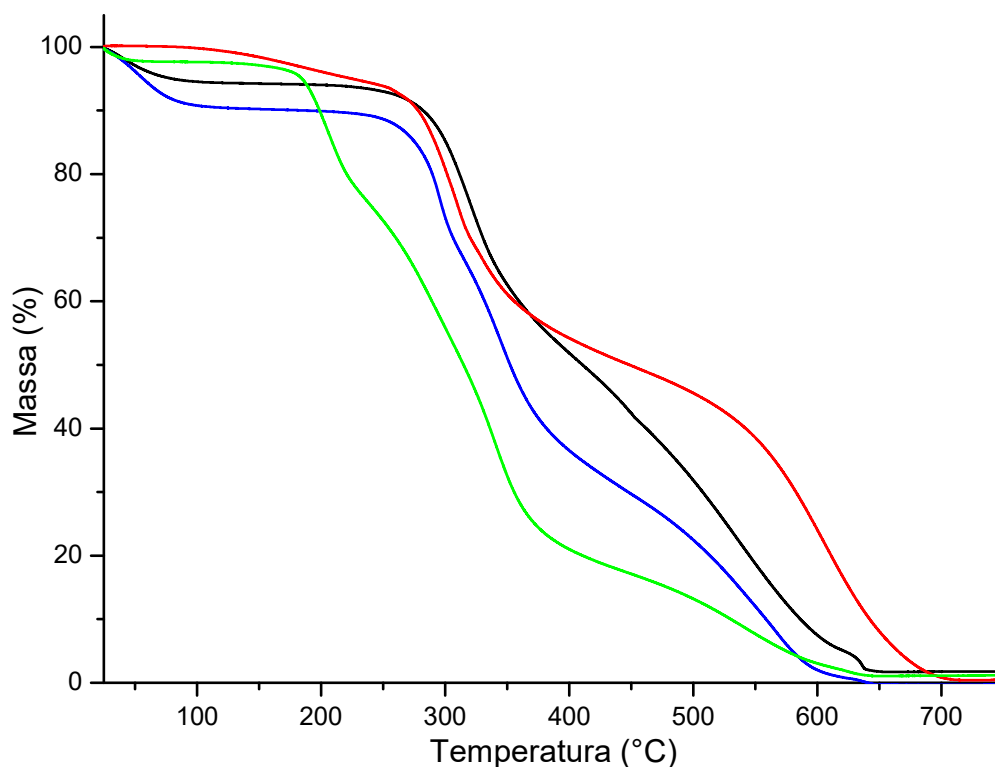
Amostra	Etapas de variação de temperatura (°C)	% Perda de Massa	T_{onset} (°C)
Fibra	25 – 200	5,9	286,1
	200 – 400	42,0	
	400 – 750	50,3	
Micro	25 – 200	10,1	276,0
	200 – 425	57,3	
	425 – 750	32,8	
nEtOH	25 – 200	4,1	270,0
	200 – 400	42,0	
	400 – 750	54,1	
SF1T20	25 – 125	2,5	184,1
	125 – 235	21,4	
	235 – 440	58,3	
	440 – 750	16,7	

A amostra de nEtOH, teve um comportamento similar com uma perda de água de 4,1 % entre 25 – 200 °C e uma T_{onset} de degradação em 270 °C. Porém a perda de massa na degradação é mais lenta em relação às outras amostras, estando relacionado com um maior conteúdo de estruturas de folha β e maior cristalinidade devido ao tratamento com etanol [82]. Essa amostra apresenta então estabilidade térmica similar à da fibra, conseguindo ser degradada totalmente perto dos 700 °C, com um resíduo menor ao 1 % da massa.

Finalmente, as partículas obtidas por aspersão no *Nano Spray Dryer*, SF1T20, apresentaram uma primeira perda de massa entre 25 – 125 °C correspondente ao 2,5 % da massa total. A degradação teve um T_{onset} 184,1 °C, mas ocorreu em duas fases, sendo que a primeira está associada à oxidação térmica do

Tween 20 [83] até 235 °C e corresponde a uma perda de massa do 21,4 %. Logo depois, começa a degradação da FS com o rompimento das ligações peptídicas. A perda de massa de 58,3 % que ocorre até os 440 °C, e o resíduo final é menor ao 1 % da massa inicial. O comportamento da amostra mostra que a adição do surfactante compromete a estabilidade térmica do material, porém a temperaturas menores que 125 °C o comportamento é similar as amostras obtidas pelos outros métodos, somente tendo sido observado a perda de água.

Figura 27. Análise termogravimétrica das partículas obtidas por aspersão em nitrogênio líquido (—), precipitação em etanol (—), aspersão no *Nano Spray Dryer* (—) e a fibra de FS (—) antes de ser dissolvida.



5.2.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As medições das distribuições de tamanho obtidas por espalhamento de luz são observadas na Figura 28 e na Tabela 4.

As duas primeiras amostras de partículas obtidas por precipitação em solventes orgânicos mostraram um comportamento similar com uma média no diâmetro hidrodinâmico (D_h) das partículas de $269,1 \pm 58,7$ nm para a amostra nMeOH com um índice de polidispersividade (PDI) de $0,254 \pm 0,038$ e de $251,2 \pm 70,8$ nm para a nEtOH1 com um PDI de $0,175 \pm 0,017$. As duas distribuições são unimodais, onde

a maioria das partículas apresentam um diâmetro hidrodinâmico dentro da faixa de 200 – 350 nm.

Figura 28. Distribuições de tamanho por DLS para as amostras nEtOH1 (—), nEtOH2 (• • •), nMeOH (— —), SF1T20 (▪ — ▪ — ▪) e SF1T20AZT (—).

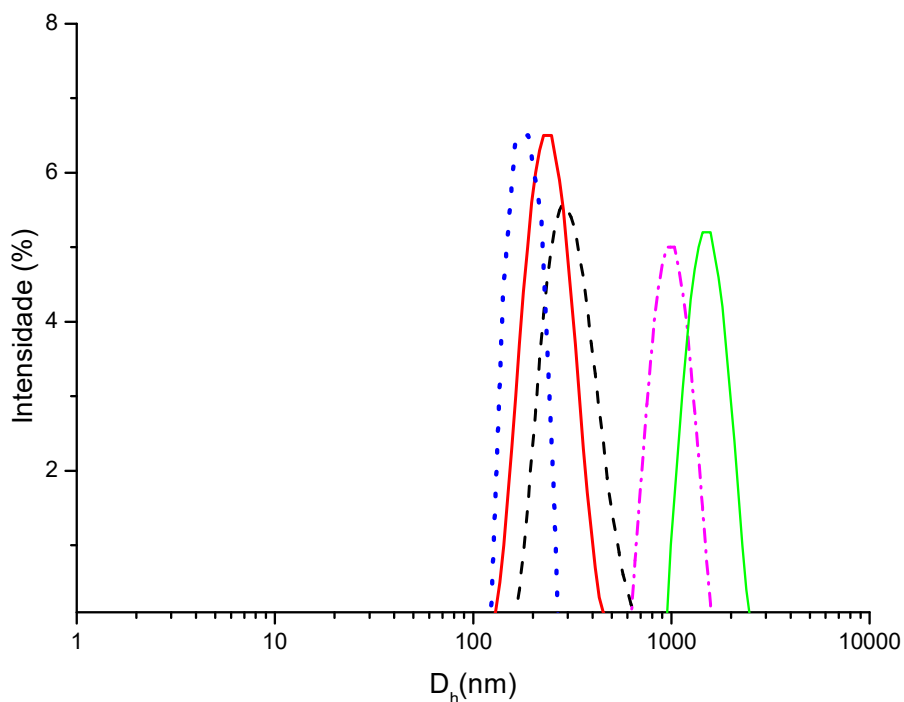


Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico das partículas obtidas por precipitação em solventes orgânicos (nEtOH1, nEtOH2 e nMeOH) e aspersão no equipamento *Nano Spray Dryer* (SF1T20, SF1T20AZT).

Amostra	D_h [nm]	PDI
nEtOH1	$251,2 \pm 21,8$	$0,17 \pm 0,02$
nEtOH2	$185,1 \pm 2,8$	$0,11 \pm 0,02$
nMeOH	$269,1 \pm 38,7$	$0,25 \pm 0,04$
SF1T20	$1214,3 \pm 559,9$	$0,45 \pm 0,16$
SF1T20AZT	$1645,3 \pm 875,4$	$0,48 \pm 0,08$

Com o objetivo de observar a estabilidade das partículas no tempo, as suspensões das amostras de nEtOH1 e nMeOH foram armazenadas até 28 dias após a diálise a uma temperatura de 9 °C. Na Tabela 5 é possível observar as mudanças nos diâmetros hidrodinâmicos e os índices de polidispersividade (PDI). Mesmo com aumentos de tamanho e dispersão em ambas as amostras, as partículas obtidas por

precipitação em etanol, nEtOH1, mostraram maior estabilidade ao longo do tempo quando comparadas a amostra nMeOH mantendo valores similares no dia da obtenção e após 28 dias. Devido aos resultados apresentados nesse teste, foi escolhida a amostra obtida por precipitação em etanol para as caracterizações.

Tabela 5. Análise do diâmetro hidrodinâmico no tempo para as amostras nEtOH1 e nMeOH.

Amostra	Dia 1		Dia 28	
	D _h [nm]	PDI	D _h [nm]	PDI
nEtOH1	251,2 ± 21,8	0,18 ± 0,02	294,8 ± 50,3	0,22 ± 0,07
nMeOH	269,1 ± 38,7	0,25 ± 0,04	443,6 ± 63,8	0,31 ± 0,07

Após a otimização do método de obtenção de nanopartículas por precipitação em etanol com o dispositivo de atomização LMA® MAD, as nanopartículas da amostra nEtOH2 tiveram um diâmetro hidrodinâmico de 185,1 ± 2,8 nm com um PDI de 0,11 ± 0,02, resultando em uma diminuição do tamanho do diâmetro hidrodinâmico de 26,31 % e PDI de 34,85 % com relação à amostra nEtOH1, ou seja, apresentando nanopartículas menores e com tamanhos mais homogêneos. O uso desse dispositivo de atomização na formação de nanopartículas de FS não tem sido descrito na literatura.

No caso das amostras obtidas por aspersão no equipamento de *Nano Spray Dryer*, a média do diâmetro hidrodinâmico foram muito maiores comparados com as partículas obtidas por precipitação em solventes orgânicos. A amostra SF1T20, apresentou um valor de 1214,3 ± 559,9 com um PDI de 0,45 ± 0,16, com uma grande parte das partículas no intervalo entre 700 – 900 nm, quase quatro vezes maior a amostra nEtOH2. Por outro lado, a amostra SF1T20AZT carregada com o fármaco, teve um diâmetro hidrodinâmico de 1645,3 ± 875,4 com um PDI de 0,48 ± 0,08, de acordo com o esperado devido ao aumento da viscosidade da solução de FS com a adição do AZT, impedindo assim a formação de partículas menores.

A maior influência no tamanho das partículas é a membrana usada na secagem no *Nano Spray Dryer*, tendo sido utilizada a menor membrana de menor

poro disponível (4 μm), as partículas obtidas a partir da amostra SF1T20 tem um tamanho similar aos descritos na literatura para a secagem de outros materiais, com a mesma membrana, como a albumina (1,2 – 10 μm) [84], PLGA e PVA (700 – 850 nm) [85], PEG (500 – 800 nm) [86] e FS (1,23 \pm 0,55 μm) [42]. O método de secagem com este equipamento faz que parâmetros como a concentração da solução (que afeta a viscosidade) e o mencionado tamanho do poro da membrana influenciem a formação de partículas de tamanhos heterogêneos. Outros fatores como a temperatura de entrada na cabeça do *spray*, a intensidade do *spray* e o uso de soluções com solventes diferentes da água, que também tem uma influência de menor grau sobre o tamanho de partícula [87], poderiam melhorar a distribuição de tamanho bem como sua homogeneidade.

5.2.6 Potencial Zeta

A Tabela 6 apresenta os resultados das medições do potencial Zeta nas amostras nEtOH2 e SF1T20. No caso da amostra obtida por precipitação em etanol após a otimização do método, nEtOH2, o valor de potencial Zeta foi de $-38,42 \pm 3,54$ mV, enquanto as partículas obtidas por aspersão no *Nano Spray Dryer* tiveram um valor de $-30,22 \pm 3,13$ mV.

Devido às possíveis interações das partículas com diferentes materiais no corpo, como fosfolipídeos, polissacarídeos e proteínas, o potencial Zeta é associado à estabilidade e pode variar entre +100 e -100 mV [88]. Os valores obtidos classificam ambas as amostras na categoria de altamente estáveis, devido ao valor ser < -30 mV. O sinal negativo do potencial mostra que as partículas são de natureza aniônica, o que concorda com a literatura relacionada às partículas de FS obtidas por outros métodos [25, 43, 89]. Os valores do potencial foram muito próximos e sugerem que as amostras têm uma densidade de carga menor junto com uma menor repulsão eletrostática entre as partículas. Essa pequena repulsão eletrostática favorece a baixa agregação das partículas [49].

Tabela 6. Valores de potencial Zeta para as amostras nEtOH2 e SF1T20.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
nEtOH2	$-38,42 \pm 3,54$

SF1T20

 $-30,22 \pm 3,13$

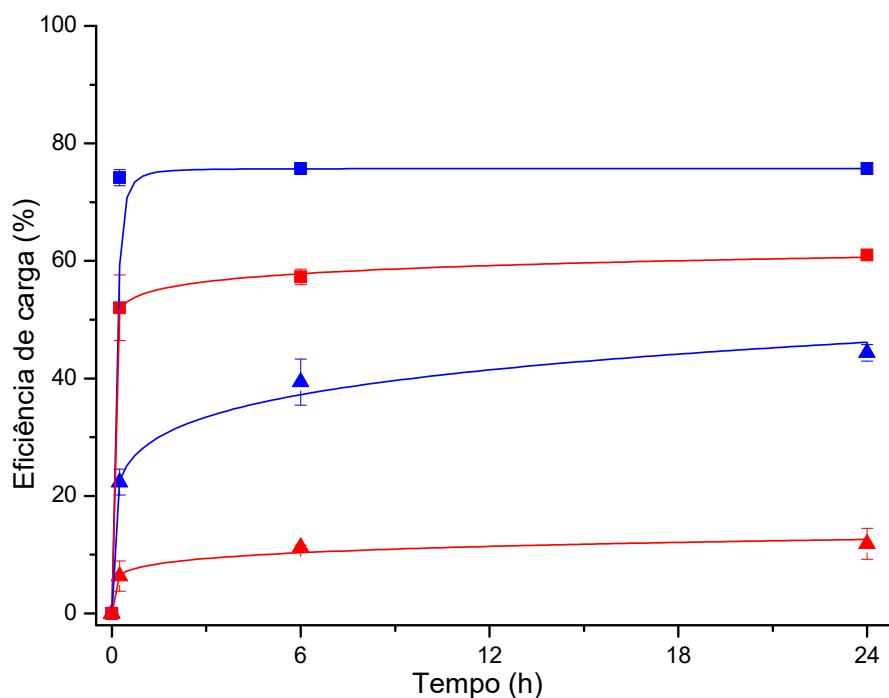
5.3 Incorporação do fármaco/ativo

5.3.1 Modelos de eficiência de incorporação

Nos modelos de eficiência de incorporação apresentados na Figura 29, é possível observar as porcentagens de eficiência de incorporação dos corantes rodamina B (RhB) e cristal violeta (CV) das nanopartículas obtidas por precipitação em etanol (nEtOH) e aspersão no equipamento *Nano Spray Dryer* (SF1T20)

A rodamina B apresentou uma média de $57,93 \pm 2,71$ % de eficiência de incorporação após 24 h da incorporação para a amostra nEtOH e de $11,88 \pm 1,43$ % para a amostra SF1T20, indicando uma interação entre o corante e as nanopartículas de FS. No transcurso das 24 h houve um acréscimo da incorporação de aproximadamente 6 % no caso da amostra nEtOH e de 8 % na amostra SF1T20. Por outro lado, a incorporação do cristal violeta nas nanopartículas teve valores de eficiência maiores em ambas amostras, sendo de $89,42 \pm 2,53$ e $44,54 \pm 2,04$ % passadas 24 h da incorporação para a amostra nEtOH e SF1T20, respectivamente.

Figura 29. Eficiência de incorporação dos corantes rodamina B (—) e cristal violeta (—) em nanopartículas da amostra nEtOH (■) e SF1T20 (▲).



Foi possível evidenciar que as partículas obtidas por ambos métodos conseguem servir como carregadores dos corantes. A absorção dos corantes foi baseada em interações eletrostáticas com as partículas, assim uma maior incorporação de CV em comparação a RhB está de acordo com o esperado devido a molécula de CV possuir carga positiva. Por outro lado, a molécula de RhB tem comportamento de íon híbrido o que dificulta a interação de carga com as partículas de FS carregadas negativamente. Lammel *et al* [43] obtiveram os resultados de carga similares com nanopartículas obtidas pelo método de *salting out* em fosfato de potássio, assim os métodos de precipitação em etanol e aspersão no equipamento de *Nano Spray Dryer* possibilitam a obtenção de nanopartículas de FS aptas para incorporar pequenas moléculas.

As diferenças na incorporação dos corantes entre as amostras nEtOH e SF1T20 pode ser atribuída a vários fatores. Primeiramente, durante o método de aspersão no equipamento de *Nano Spray Dryer* as partículas de FS são submetidas a cargas e descargas eletrostáticas até ser coletado, o que reflete na sua carga de superfície final, resultando em partículas menos carregadas negativamente quando comparadas com a amostra nEtOH, como foi visto no resultado do potencial Zeta. Essa diferença nas cargas das partículas vai diminuir as interações com moléculas carregadas positivamente como os corantes testados. Além disso, a amostra SF1T20 tem a influência do Tween 20 que está presente na sua conformação, e que mesmo sendo um surfactante não iônico tem sido mostrado que pode influenciar nas mudanças das interações eletrostáticas de outros tipos nanopartículas [90, 91].

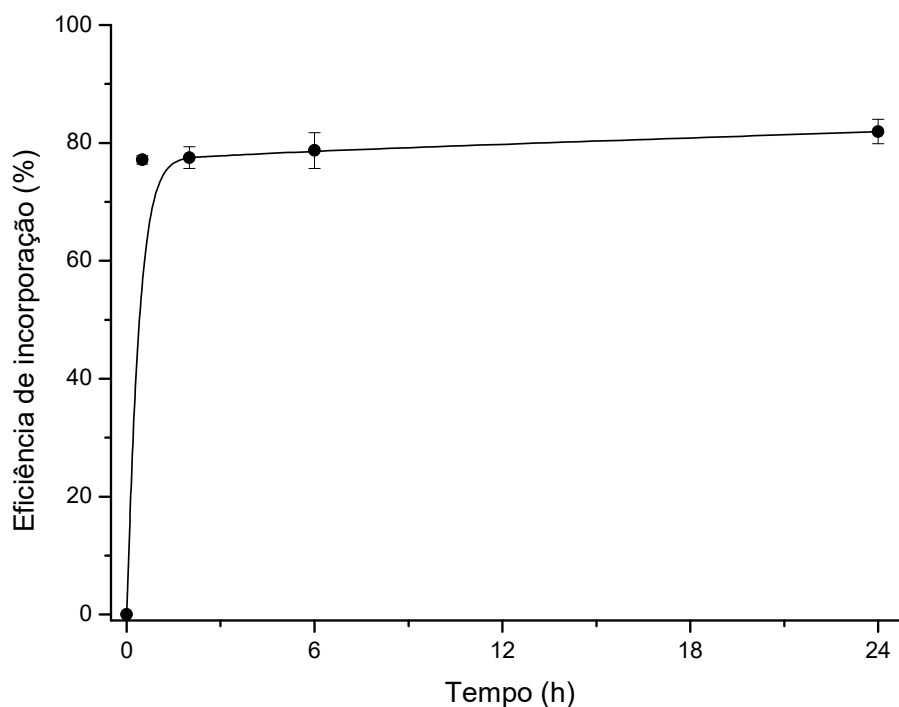
5.3.2 Incorporação e liberação da doxorubicina

A eficiência de incorporação e porcentagem liberado da doxorubicina (DOX) na amostra de partículas obtidas pelo método de precipitação em solventes orgânicos (nEtOH) são apresentados nas Figuras 30 e 31.

A DOX apresentou um valor máximo de $81,92\% \pm 2,08$ após 24 h de incorporação (Figura 30), mostrando uma alta interação com as nanopartículas de FS com o fármaco. O principal motivo da alta incorporação são as interações eletrostáticas entre as partículas de FS carregadas negativamente no pH 7,4 e a levemente básica DOX [49]. Wongpinyochit *et al.*[92], obtiveram eficiências de

incorporação superiores ao 90 % em partículas de FS cobertas de PEG na sua superfície, resultado muito próximo ao obtido neste trabalho.

Figura 30. Eficiência de incorporação da doxorubicina nas partículas obtidas pelo método de precipitação em etanol (●).

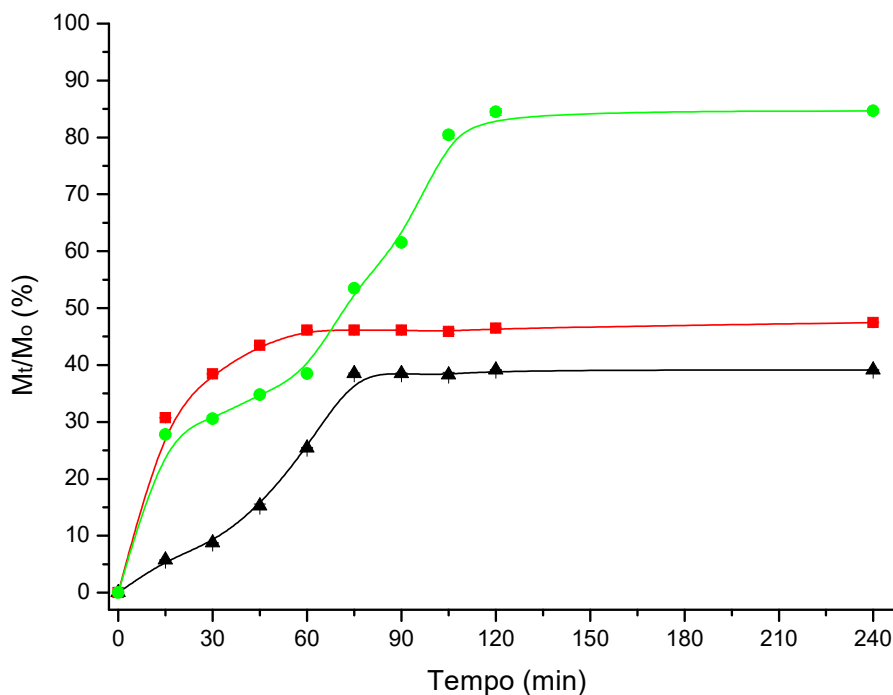


Os estudos de liberação da DOX (Figura 31) foram realizados em pH 5,0; 7,4 e 9,0. O pH 7,4 foi escolhido para simular o pH sanguíneo. O pH de 5,0 foi escolhido para simular o pH dos endossomos, lisossomos e do tecido tumoral, que é alterado por causa do metabolismo das células cancerígenas deixando o pH mais ácido [49, 93]. Finalmente o pH 9,0 foi escolhido para ver o comportamento das nanopartículas em meio alcalino e também para simular o pH do intestino delgado [94]. Na Figura 31, o M_t que representa a quantidade absoluta de DOX liberada no tempo t e M_0 a quantidade inicial de fármaco.

Foi possível evidenciar que a liberação da DOX é dependente do pH, nos três perfis de liberação observou-se liberação inicial imediata (*burst effect*) correspondente à liberação da DOX existente na superfície das partículas. No caso do pH 5,0 esse efeito foi o mais curto atingindo um máximo de $38,47 \pm 2,18$ % fármaco liberado entorno dos 60 min. No pH 7,4, a liberação atingiu seu máximo após 75 min liberando $46,15 \pm 1,33$ %. Finalmente, a máxima liberação foi atingida no pH 9,0 onde mais do $83,55 \pm 1,58$ %, contudo isto ocorreu somente aos 120 min. As

diferenças nos perfis de liberação são atribuídas principalmente a mudanças nas interações de carga, assim a porcentagem de DOX liberada é altamente dependente do pH (sendo $\text{pH } 5,0 < \text{pH } 7,4 < \text{pH } 9,0$) o que concorda com trabalhos prévios [64, 92, 95].

Figura 31. Porcentagem de doxorubicina (DOX) liberada da amostra nEtOH a pH 5,0 (▲); 7,4 (■) e 9,0 (●).



5.3.3 Incorporação e liberação da zidovudina

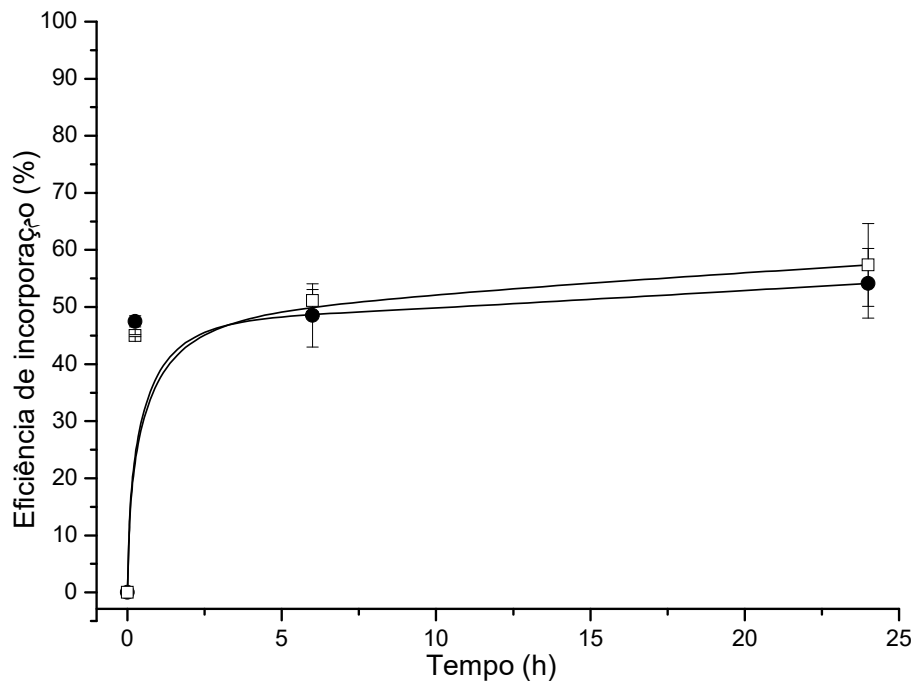
A eficiência de incorporação e porcentagem liberada da zidovudina (AZT) na amostra de partículas obtidas pelo método de precipitação em solventes orgânicos (nEtOH) e aspersão no equipamento *Nano Spray Dryer* (SF1T20 e SF1T20AZT) são apresentados nas Figuras 32, 33 e 34.

A eficiência de incorporação da AZT nas amostras nEtOH e SF1T20 teve um valor próximo em ambos os casos (Figura 32) e de $57,35 \pm 7,24 \%$ e $54,15 \pm 6,04 \%$, respectivamente, não existindo diferença estatística na incorporação entre os dois métodos de obtenção de partículas. Além disso, não foi observada a precipitação do fármaco durante o processo de incorporação.

Christopher et al. [68], obtiveram valores de incorporação de AZT entre 28 – 59,5 % em nanopartículas de PLGA e perceberam que o conteúdo de polímero influencia na eficiência de incorporação. No caso das amostras estudadas a

concentração de FS nas suspensões usadas foi diferente devido a adição de 0,05 % em relação a massa da proteína e do surfactante na amostra SF1T20. A presença de domínios hidrofóbicos na estrutura da FS também pode ter propiciado a incorporação do fármaco com natureza hidrofílica, similarmente ao comportamento observado com nanopartículas de alginato recobertas de Pluronic F68 descrito por Joshy et al [96].

Figura 32. Eficiência de incorporação da AZT nas partículas obtidas por precipitação em etanol (□) e aspersão no *Nano Spray Dryer* (●).

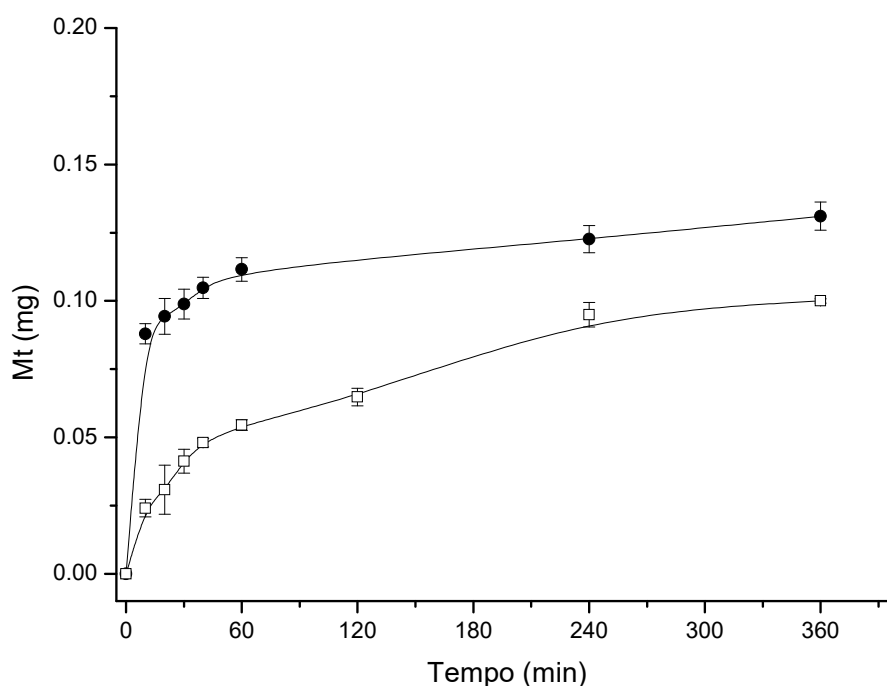


Os perfis de liberação da AZT apresentados nas Figura 33 e Figura 34 correspondem às partículas obtidas por precipitação em etanol e aspersão no *Nano Spray Dryer*, onde a AZT foi incorporada depois da formação das partículas (Figura 33) e antes da secagem da solução no equipamento de *Nano Spray Dryer* (Figura 34). O pH de 7,4 foi escolhido para a liberação para simular o pH sanguíneo.

Na Figura 33, M_t representa a quantidade absoluta de AZT liberada no tempo t , o cálculo da quantidade inicial de fármaco incorporada M_0 foi realizada inicialmente usando os valores de absorvância do sobrenadante após a incorporação, porém devido às diluições e à sensibilidade do espectrofotômetro de UV-vis, os dados obtidos mostraram um erro grande. Devido a isso, decidiu-se apresentar os dados da massa da AZT liberada por tempo. Assim, às partículas obtidas por aspersão no *Nano*

Spray Dryer (SF1T20) foi $36,94 \pm 5,65$ % maior do que nas partículas obtidas por precipitação em solventes orgânicos (nEtOH) após 6 h de liberação. Porém, a liberação da amostra SF1T20 começou também com um efeito *burst* inicial que liberou $86,85 \pm 3,54$ % do AZT na primeira hora, contra um $58,66 \pm 1,32$ % liberado pela amostra nEtOH. Assim, a liberação de AZT pela amostra nEtOH foi mais controlada no tempo quando comparada com a da amostra SF1T20.

Figura 33. Perfil de liberação do AZT nas partículas obtidas por precipitação em etanol (□) e por aspersão no *Nano Spray Dryer* (●) em pH 7,4.

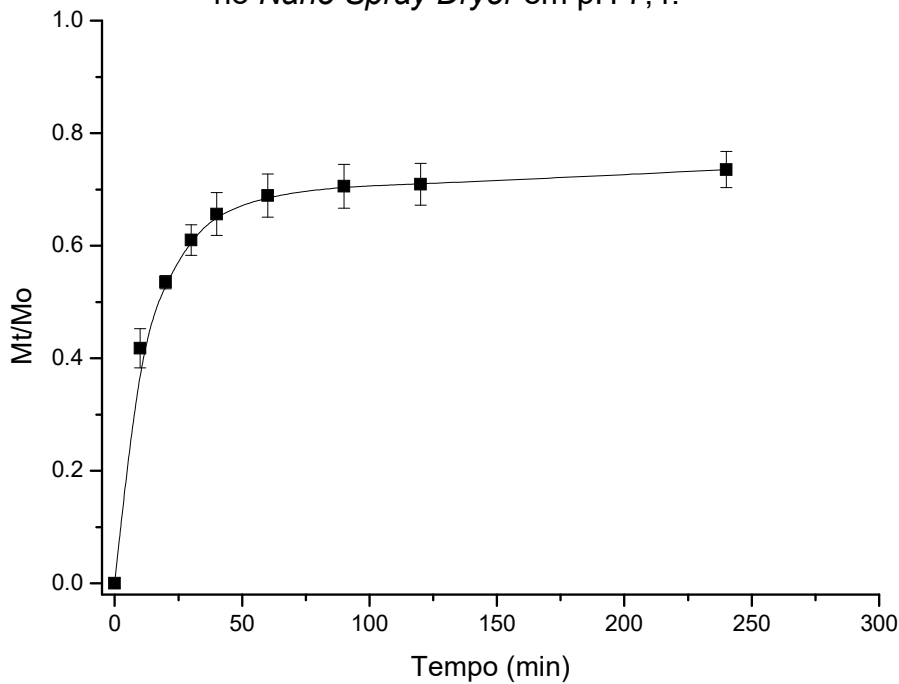


Essas diferenças podem ter sido causadas por muitos fatores, entre os principais temos as interações eletrostáticas de cada amostra com o fármaco e o meio; a proporção de fármaco na superfície e em regiões mais internas das partículas; e o efeito da interação do fármaco com o surfactante utilizado na obtenção da amostra SF1T20. Assim, a liberação mais lenta da AZT, sugere que a amostra nEtOH tem interações carga – carga mais fortes com o fármaco quando comparada com a amostra SF1T20.

No caso da amostra SF1T20AZT, onde a zidovudina foi dissolvida na solução de FS antes da aspersão no equipamento *Nano Spray Dryer* o perfil de liberação (Figura 34) foi calculado com M_t que representa a quantidade absoluta de AZT liberada no tempo t e M_0 a quantidade inicial de fármaco dissolvido na solução de FS. Foi observada uma liberação inicial rápida ou efeito *burst* nos primeiros 60 min,

devido à liberação do fármaco localizado na parte superficial das partículas. E teve uma liberação máxima de $76,24 \pm 5,49$ % em relação à massa inicial adicionada em 120 min de liberação.

Figura 34. Perfil de liberação do AZT da amostra SF1T20AZT obtida por aspensão no *Nano Spray Dryer* em pH 7,4.



O uso de partículas de FS obtidas por aspensão no equipamento de *Nano Spray Dryer* na incorporação e liberação da AZT é inédito na literatura, porém alguns outros autores têm avaliado modelos similares encontrando resultados similares em termos de liberação. Sithole *at al.* [97], obtiveram partículas de FS, usando o equipamento de *Nano Spray Dryer*, com a capacidade de encapsular e liberar outros antivirais como o aciclovir chegando também em uma liberação próxima do 70 % do fármaco incorporado nas primeiras 5 h de liberação. O método de encapsulação da AZT em partículas de FS obtidas por aspensão no equipamento de *Nano Spray Dryer* desenvolvido mostra-se como uma alternativa inovadora e com muito potencial na área de liberação de fármaco.

6. CONCLUSÕES

Foi possível obter partículas esféricas de FS pelos métodos de precipitação em etanol, em metanol e aspersão no equipamento *Nano Spray Dryer*. Porém, o tamanho das partículas obtidas usando esse último foi consideravelmente maior do que o obtido por precipitação em etanol, com diâmetros hidrodinâmicos por volta de 200 nm.

Características como tamanho de partícula, estabilidade térmica, conteúdo de estruturas de folha β e o potencial Zeta foram altamente dependentes do método de obtenção. Assim, as partículas obtidas por precipitação em etanol mostraram um tamanho de partícula menor, maior conteúdo de estruturas de folha β e maior estabilidade térmica e eletrostática quando comparadas com as partículas obtidas por aspersão no equipamento *Nano Spray Dryer*.

Os modelos de incorporação mostraram que todas as amostras testadas conseguiram incorporar os corantes RhB e CV. Os perfis preliminares de liberação da DOX e a AZT mostraram que as partículas de FS obtidas tem potencial para serem usadas como veículos e permitem uma liberação controlada. As diferenças nas velocidades e quantidade de fármaco liberado são atribuídas principalmente às diferenças nas interações eletrostáticas e ao efeito do surfactante usado na aspersão no equipamento de *Nano Spray Dryer*.

Finalmente, a incorporação e liberação da AZT por partículas de FS obtidas por aspersão no equipamento de *nano Spray Dryer* se apresenta como um resultado inédito na literatura e mostra o potencial que desse material na farmacologia moderna. Os estudos de incorporação e liberação mostraram que, no caso da DOX foi incorporada $81,92 \pm 2,08 \%$ após 24 h e houve uma liberação máxima de $83,55 \pm 1,58 \%$ no pH 9,0 após 6 h; já a AZT teve uma eficiência de incorporação por volta de $57,35 \pm 7,24 \%$ e a liberação das partículas obtidas por aspersão no *Nano Spray Dryer* (SF1T20) foi $36,94 \pm 5,65 \%$ maior do que nas partículas obtidas por precipitação em etanol (nEtOH) após 6 h. As amostras SF1T20 e nEtOH mostraram-se como materiais com alto potencial para a liberação controlada de fármacos.

7. ETAPAS FUTURAS

As próximas etapas deste trabalho incluem planejar o processo de patente do processo de obtenção de partículas de FS por aspersão usando o equipamento de *Nano Spray Dryer*. Assim como a publicação dos resultados em uma revista da área.

Em trabalhos futuros, pode-se pensar em testes que permitam avaliar os efeitos citotóxicos das partículas no corpo humano. Estudos de internalização celular das nanopartículas são muito interessantes, permitindo saber os mecanismos de endocitose celular usados dando um feedback sobre a melhor morfologia e tamanho adequado além do uso de modelos animais para estudar a liberação *in vivo*.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] G. M. Raghavendra, K. Varaprasad, and T. Jayaramudu, *Biomaterials: design, development and biomedical applications*. Elsevier Inc., 2015.
- [2] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: state of the art and future trends," *Macromol Biosci*, vol. 4, 2004.
- [3] C. Sobajo, F. Behzad, X. Yuan, and A. Bayat, "Silk: a potential medium for tissue engineering.," *Eplasty*, vol. 8, p. e47, 2008.
- [4] C. Zeng *et al.*, "Silk fibroin porous scaffolds for nucleus pulposus tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, no. 1, pp. 232–240, 2014.
- [5] Z. Zhao, Y. Li, and M. Bin Xie, "Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 4880–4903, 2015.
- [6] K. Numata and D. L. Kaplan, "Silk-based delivery systems of bioactive molecules ☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 15, pp. 1497–1508, 2010.
- [7] F. P. Seib, "Silk nanoparticles—an emerging anticancer nanomedicine," *AIMS Bioeng.*, vol. 4, no. 2, pp. 239–258, 2017.
- [8] R. Yunus Basha, S. K. T.S., and M. Doble, "Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 452–463, Dec. 2015.
- [9] B. D. Ratner, *A history of biomaterials*. Elsevier, 2013.
- [10] S. Bose and A. Bandyopadhyay, *Introduction to Biomaterials*. Elsevier, 2013.
- [11] A. M. Tataru, A. Ratcliffe, M. E. K. Wong, F. K. Kasper, and A. G. Mikos, *Biomaterials in Regenerative Medicine: Considerations in Early Process Development*, no. Figure 1. Elsevier Inc., 2015.
- [12] X. Fu, J. Cai, X. Zhang, W. Li, H. Ge, and Y. Hu, "Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 132, pp. 169–187, 2018.
- [13] M. F. Maitz, "Applications of synthetic polymers in clinical medicine," *Biosurface and Biotribology*, vol. 1, no. 3, pp. 161–176, Aug. 2015.
- [14] S. Das, U. Bora, and B. B. Borthakur, *Applications of silk biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine*. Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [15] J.-H. Kim *et al.*, "Osteoinductive silk fibroin/titanium dioxide/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering.," *Int. J. Biol. Macromol.*, Aug. 2015.
- [16] C. Vepari and D. L. Kaplan, "Silk as a Biomaterial.," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 991–1007, Jan. 2007.
- [17] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 1–16, 2015.
- [18] U.-J. Kim, J. Park, H. J. Kim, M. Wada, and D. L. Kaplan, "Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin.," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2775–85, May 2005.
- [19] M. Bobel and M. Woltje, "Natural biodegradable medical polymers: Silk," in

Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers, 2017, pp. 351–376.

- [20] H.-J. Jin and D. L. Kaplan, “Mechanism of silk processing in insects and spiders,” *Nature*, vol. 424, no. 6952, pp. 1057–1061, 2003.
- [21] S. Ling, Z. Qin, C. Li, W. Huang, D. L. Kaplan, and M. J. Buehler, “Polymorphic regenerated silk fibers assembled through bioinspired spinning,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 1387, 2017.
- [22] S. Thomas, N. Ninan, S. Mohan, and E. Francis, *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs*. Apple Academic Press, 2012.
- [23] S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, and D. L. Kaplan, “Functionalized silk-based biomaterials for bone formation,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 139–148, 2001.
- [24] V. Karageorgiou, L. Meinel, S. Hofmann, A. Malhotra, V. Volloch, and D. Kaplan, “Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 71, no. 3, pp. 528–537, 2004.
- [25] A. A. Lozano-Pérez *et al.*, “Silk fibroin nanoparticles: Efficient vehicles for the natural antioxidant quercetin,” *Int. J. Pharm.*, vol. 518, no. 1–2, pp. 11–19, Feb. 2017.
- [26] Y.-Q. Zhang, W.-D. Shen, R.-L. Xiang, L.-J. Zhuge, W.-J. Gao, and W.-B. Wang, “Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 885–900, Jun. 2007.
- [27] R. Mahato, *Multifunctional Micro- and Nanoparticles*. Elsevier, 2017.
- [28] P. Mäki-arvela and D. Y. Murzin, “A General Effect of catalyst synthesis parameters on the metal particle size,” *Applied Catal. A, Gen.*, vol. 451, pp. 251–281, 2013.
- [29] S. Priyadarsini, S. Mukherjee, and M. Mishra, “Nanoparticles used in dentistry: A review,” *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 58–67, 2018.
- [30] H. K. S. Yadav, M. Dibi, and A. Mohammed, *Chapter 6. Biopharmaceutics and pharmacokinetics of multifunctional nanoparticles*. Elsevier Inc., 2018.
- [31] N. Kumar and S. Kumbhat, “Nanomaterials,” in *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, pp. 149–188.
- [32] A. Biswas, I. S. Bayer, A. S. Biris, T. Wang, E. Dervishi, and F. Faupel, “Advances in top – down and bottom – up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 170, no. 1–2, pp. 2–27, 2012.
- [33] T. Belmonte and H. Kabbara, “Synthesis of copper and zinc nanostructures by discharges in liquid nitrogen,” vol. 207, pp. 350–358, 2018.
- [34] M. Tarhini, H. Greige-Gerges, and A. Elaissari, “Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules,” *Int. J. Pharm.*, vol. 522, no. 1–2, pp. 172–197, 2017.
- [35] S. Dreis, F. Rothweiler, M. Michaelis, J. C. Jr, J. Kreuter, and K. Langer,

8. BIBLIOGRAFIA

- “Preparation , characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 341, pp. 207–214, 2007.
- [36] A. Jahanban-esfahlan, S. Dastmalchi, and S. Davaran, “International Journal of Biological Macromolecules A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 91, pp. 703–709, 2016.
- [37] C. Arpagaus, P. John, A. Collenberg, and D. Rütli, “Nanocapsules formation by nano spray drying,” in *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*, Elsevier Inc., 2017, pp. 346–401.
- [38] S. Harsha, A. Asif, and I. Abdulrahman, “Nanoparticle formulation by Büchi B-90 Nano Spray Dryer for oral mucoadhesion,” *Drug Des. Devel. Ther.*, no. 9, pp. 273–282, 2015.
- [39] S. H. Lee, D. Heng, W. K. Ng, H.-K. Chan, and R. B. H. Tan, “Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy,” *Int. J. Pharm.*, vol. 403, no. 1, pp. 192–200, 2011.
- [40] X. Li, N. Anton, C. Arpagaus, F. Belleteix, and T. F. Vandamme, “Nanoparticles by spray drying using innovative new technology : The Büchi Nano,” *J. Control. Release*, vol. 147, no. 2, pp. 304–310, 2010.
- [41] A. M. Oliveira, K. L. Guimarães, N. N. P. Cerize, A. S. Tunussi, and J. G. R. Poço, “Nano Spray Drying as an Innovative Technology for Encapsulating Hydrophilic Active Pharmaceutical Ingredients (API),” *Nanomedicine Nanotechnol.*, vol. 4, no. 6, 2013.
- [42] I. Schultz *et al.*, “Pulmonary Insulin-like Growth Factor I Delivery from Trehalose and Silk-Fibroin Microparticles,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, no. 1, pp. 119–129, 2015.
- [43] A. S. Lammel, X. Hu, S. H. Park, D. L. Kaplan, and T. R. Scheibel, “Controlling silk fibroin particle features for drug delivery,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 16, pp. 4583–4591, 2010.
- [44] Y. Q. Zhang, W. De Shen, R. L. Xiang, L. J. Zhuge, W. J. Gao, and W. B. Wang, “Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 885–900, 2007.
- [45] Z. Cao, X. Chen, J. Yao, L. Huang, and Z. Shao, “The preparation of regenerated silk fibroin microspheres,” *Soft Matter*, vol. 3, no. 7, p. 910, 2007.
- [46] J. Qu, Y. Liu, Y. Yu, J. Li, J. Luo, and M. Li, “Silk fibroin nanoparticles prepared by electrospray as controlled release carriers of cisplatin,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 44, pp. 166–174, 2014.
- [47] Y. Huang, K. Bailey, S. Wang, and X. Feng, “Silk fibroin films for potential applications in controlled release,” *React. Funct. Polym.*, vol. 116, no. February, pp. 57–68, 2017.
- [48] X. Li *et al.*, “Soft freezing-induced self-assembly of silk fi broin for tunable gelation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 691–695, 2018.
- [49] L. Xiao, G. Lu, Q. Lu, and D. L. Kaplan, “Direct Formation of Silk Nanoparticles for Drug Delivery,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, p. acsbiomaterials.6b00457, 2016.

- [50] Y. Tian, X. Jiang, X. Chen, Z. Shao, and W. Yang, "Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer," *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 43, pp. 7393–7398, 2014.
- [51] P. M. A. Coimbra, "Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural," Universidade de Coimbra, 2010.
- [52] J. Safari and Z. Zarnegar, "Advanced drug delivery systems : Nanotechnology of health design A review," *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 18, no. 2, pp. 85–99, 2014.
- [53] G. Reina *et al.*, "Rhodamine / Nanodiamond as a System Model for Drug Carrier," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 15, no. 1022–1029, 2015.
- [54] J. Kennedy *et al.*, "In vivo studies investigating biodistribution of nanoparticle-encapsulated rhodamine B delivered via dissolving microneedles," *J. Control. Release*, vol. 265, no. December 2016, pp. 57–65, 2017.
- [55] M. Van Der Auweraer, B. Verschuere, and F. C. De Schryver, "Absorption and Fluorescence Properties of Rhodamine B Derivatives Forming Langmuir-Blodgett Films," *Am. J. Chem. Soc.*, no. 3, pp. 583–588, 1988.
- [56] H. F. Fairbairn, "Thermal Responsive Release of a Model Drug , Rhoadmine B , from Alginate Bead System," 2016.
- [57] X. Wang, T. Yucel, and D. L. Kaplan, "Silk Nanospheres and Microspheres from Silk/PVA Blend Films for Drug Delivery," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1025–1035, 2010.
- [58] Sigma-Aldrich, "Product Specification - Rhodamine B," 2010. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/rhodamineb479018188911?lang=en®ion=CA>. [Accessed: 20-Oct-2018].
- [59] A. S. Crystal *et al.*, "Patient-derived Models of Acquired Resistance Can Identify Effective Drug Combinations for Cancer," *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6216, pp. 1480–1486, 2014.
- [60] Sigma-Aldrich, "Product Specification - Crystal violet," 2010. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0775?lang=en®ion=CA&gclid=CjwKCAiAmO3gBRBBEiwA8d0Q4gZ6qKTBq0Mcx6pT4PFJtD6PRp94w2uCHEQQztLEh1wwOI9Hu6wQwxoCWFwQAvD_BwE. [Accessed: 21-Oct-2018].
- [61] U. Cancer Research Association, "Doxorubicin (Adriamycin)," 2017. [Online]. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/doxorubicin>. [Accessed: 11-May-2018].
- [62] A. C. Society, "Cancer Facts & Figures 2017," Atlanta, GA, 2017.
- [63] J. Prados *et al.*, "Doxorubicin-Loaded Nanoparticles : New Advances in Breast Cancer Therapy," *Anti-cancer agents medicinal Chem.*, no. 12, pp. 1058–1070, 2012.
- [64] Y. Zhang, C. Yang, W. Wang, J. Liu, Q. Liu, and F. Huang, "Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive prodrug nanoparticle for combination therapy of cancer," *Nat. Publ. Gr.*, no. February, pp. 1–12, 2016.
- [65] "Zidovudine," *Drug bank*, 2017. [Online]. Available:

8. BIBLIOGRAFIA

- <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>. [Accessed: 10-Dec-2018].
- [66] M. H. Court *et al.*, "Evaluation 3 -Azido-3 - deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 in human liver microsomes," vol. 31, no. 9, pp. 1125–1133, 2003.
- [67] J. Fischer and C. R. Ganellin, *Analogue-based Drug Discovery*. Wiley, 2006.
- [68] G. V. P. Christoper, C. V. Raghavan, K. Siddharth, M. S. Selva, and R. H. Prasad, "Formulation and optimization of coated PLGA – Zidovudine nanoparticles using factorial design and in vitro in vivo evaluations to determine brain targeting efficiency," *Saudi Pharm. J.*, vol. 22, no. 2, pp. 133–140, 2014.
- [69] S. A. Yoshioka, V. C. Montanha, and T. I. Wodewotzky, "PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS OU MICROPARTÍCULAS ESPONJOSAS OU POROSAS DE COLÁGENO OU DE FIBROÍNA," PI 1103774-1 A2, 2013.
- [70] H. Iitsuka, K. Koizumi, A. Inujima, M. Suzaki, and Y. Mizuno, "Discovery of a sugar-based nanoparticle universally existing in boiling herbal water extracts and their immunostimulant effect," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 16, no. October, pp. 62–68, 2018.
- [71] C. Fernández-díaz and O. Coste, "Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost in vitro ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages," *Algal Res.*, vol. 26, no. June, pp. 135–142, 2017.
- [72] A. . Vogel, *Química analítica quantitativa*, 5th ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.
- [73] R. F. Weska, W. Carlos, V. Jr, G. M. Nogueira, and M. M. Beppu, "Effect of Freezing Methods on the Properties of Lyophilized Porous Silk Fibroin Membranes," vol. 12, no. 2, pp. 233–237, 2009.
- [74] C. Arpagaus, P. John, A. Collenberg, and D. Rütli, "Nanocapsules formation by nano spray drying," *Nanoencapsulation Technol. Food Nutraceutical Ind.*, pp. 346–401, 2017.
- [75] M. A. Koperska *et al.*, "Degradation markers of fibroin in silk through infrared spectroscopy," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 105, no. 1, pp. 185–196, 2014.
- [76] S. Ling, Z. Qi, D. P. Knight, Z. Shao, and X. Chen, "Synchrotron FTIR microspectroscopy of single natural silk fibers," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 9, pp. 3344–3349, 2011.
- [77] Y. Zhang, W. Gu, J. Zhao, and Z. Qin, "A facile, efficient and 'green' route to pH-responsive crosslinked poly(methacrylic acid) nanoparticles," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2017.
- [78] S. Xiao, Z. Wang, H. Ma, H. Yang, and W. Xu, "Effective removal of dyes from aqueous solution using ultrafine silk fibroin powder," *Adv. Powder Technol.*, vol. 25, no. 2, pp. 574–581, Mar. 2014.
- [79] S. Ling, Z. Qi, D. P. Knight, Z. Shao, and X. Chen, "FTIR imaging, a useful method for studying the compatibility of silk fibroin-based polymer blends," *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 21, p. 5401, 2013.
- [80] H. G. Oliveira Barud *et al.*, "Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration," *Carbohydr. Polym.*, vol. 128, pp. 41–51, Sep. 2015.

- [81] S. Patil and N. Singh, "Antibacterial silk fibroin scaffolds with green synthesized silver nanoparticles for osteoblast proliferation and human mesenchymal stem cell differentiation," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 176, no. December 2018, pp. 150–155, 2019.
- [82] R. You, Y. Xu, G. Liu, Y. Liu, X. Li, and M. Li, "Regulating the degradation rate of silk fibroin films through changing the genipin crosslinking degree," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 109, pp. 226–232, Nov. 2014.
- [83] R. Kishore and H.-C. Mahler, "Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 721–731, 2011.
- [84] S. Harsha, B. E. Al-dhubiab, A. B. Nair, M. Attimarad, N. Katharigatta, and K. Sa, "Pharmacokinetics and tissue distribution of microspheres prepared by spray drying technique : targeted drug delivery .," vol. 28, no. 8, pp. 3387–3396, 2017.
- [85] N. Anzar *et al.*, "Preparation , evaluation and pharmacokinetic studies of spray dried PLGA polymeric submicron particles of simvastatin for the effective treatment of breast cancer," *J. Mol. Liq.*, vol. 249, pp. 609–616, 2018.
- [86] O. Amsalem, T. Nassar, S. Benhamron, P. Lazarovici, S. Benita, and E. Yavin, "Solid nano-in-nanoparticles for potential delivery of siRNA," *J. Control. Release*, vol. 257, pp. 144–155, 2017.
- [87] C. Draheim, F. De Crécy, S. Hansen, E. M. Collnot, and C. M. Lehr, "A design of experiment study of nanoprecipitation and nano spray drying as processes to prepare plga nano-and microparticles with defined sizes and size distributions," *Pharm. Res.*, vol. 32, no. 8, pp. 2609–2624, 2015.
- [88] C. Arpagaus, A. Collenberg, D. Rütli, E. Assadpour, and S. M. Jafari, "Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals," *Int. J. Pharm.*, vol. 546, no. 1–2, pp. 194–214, 2018.
- [89] L. Li, S. Puhl, L. Meinel, and O. Germershaus, "Silk fibroin layer-by-layer microcapsules for localized gene delivery," *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 7929–7939, 2014.
- [90] X. Wang and X. Chu, "Role of surfactant in the formation of zein/Tween-20 nanoparticles studied by fluorescence and circular dichroism," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 558, no. August, pp. 110–116, 2018.
- [91] M. Li, J. Pei, X. Tang, and X. Guo, "Effects of surfactants on the combined toxicity of TiO₂ nanoparticles and cadmium to *Escherichia coli*," *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 74, pp. 126–133, 2018.
- [92] T. Wongpinyochit, P. Uhlmann, A. J. Urquhart, and F. P. Seib, "PEGylated Silk Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 11, pp. 3712–3722, 2015.
- [93] M. A. C. Stuart *et al.*, "Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials," *Nat. Mater.*, vol. 9, no. 2, pp. 101–113, 2010.
- [94] F. Moreno-Olivas, E. Tako, and G. J. Mahler, "ZnO nanoparticles affect intestinal function in an: In vitro model," *Food Funct.*, vol. 9, no. 3, pp. 1475–1491, 2018.
- [95] F. P. Seib, G. Jones, and D. L. Kaplan, "pH-Dependent anticancer drug release from silk nanoparticles," *Adv. Heal. Mater.*, vol. 1, no. 3, pp. 233–245, 2012.

8. BIBLIOGRAFIA

- [96] K. S. Joshy, M. A. Susan, S. Snigdha, K. Nandakumar, A. P. Laly, and T. Sabu, "Encapsulation of zidovudine in PF-68 coated alginate conjugate nanoparticles for anti-HIV drug delivery," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, no. PartA, pp. 929–937, 2018.
- [97] M. Sithole and V. Pillay, "Development of a Novel Polymeric Nanocomposite Complex for Drugs with Low Bioavailability," *APPS PharmaSciTech*, vol. 5, no. 2, pp. 231–236, 2017.