

**UFMG/ICEx/DQ. 1125<sup>a</sup>**

**T. 507<sup>a</sup>**

**Michele Fabiane de Oliveira**

**ESTUDO DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES A  
BASE DE CICLODEXTRINAS E NANOFIBRAS DE  
POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PARA A LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

**Belo Horizonte**

**2015**

O482e Oliveira, Michele Fabiane de  
2015 Estudo de sistemas supramoleculares a base de  
T ciclodextrinas e nanofibras de polímeros  
biodegradáveis para a liberação controlada de fármacos  
[manuscrito] / Michele Fabiane de Oliveira. 2015.  
[xiii], 139 f. : il.

Orientadora: Rubén Dario Sinisterra Millán.  
Coorientador: Frederico Barros de Sousa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química Inorgânica - Teses 2. Ciclodextrinas -  
Teses 3. Preparações de liberação controlada - Teses  
4. Polímeros - Teses 5. Sistemas deliberados de drogas  
poliméricas - Teses I. Sinisterra Millán, Rubén Dario,  
Orientador II. Sousa, Frederico Barros de,  
Coorientador III. Título.

CDU 043

**"Estudo de Sistemas Supramoleculares a Base de Ciclodextrinas e Nanofibras de Polímeros Biodegradáveis para a Liberação Controlada de Fármacos"**

**Michele Fabiane de Oliveira**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

  
Prof. Frederico Barros de Sousa - Coorientador  
UNIFEI

  
Prof. Geraldo Magela de Lima  
UFMG

  
Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão  
UFMG

  
Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira  
UFJF

  
Profa. Eliana Martins Lima  
UFG

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2015.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof.  
Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán e a co-orientação do  
Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa

**Ao João, com todo amor e carinho**

**Aos meus pais e irmãos**

---

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas.

Ao prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra pela orientação deste trabalho sempre com muita competência profissional e segurança. Obrigada por me acolher em seu laboratório desde a Iniciação Científica e acreditar em minha capacidade, sempre me ensinando como a pesquisa científica é fascinante. Trabalhar com você todos esses anos foi muito inspirador e gratificante.

Ao prof. Dr. Frederico Barros de Sousa pela co-orientação deste trabalho. Obrigada pela grande amizade construída desde quando éramos estudantes recém-formados. Sua amizade, incentivo e, sobretudo, competência profissional foram as bases para a construção deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas discussões e sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés da Faculdade de Odontologia da UFMG pelo auxílio na realização dos experimentos de viabilidade celular.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia P. Andrade do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelo auxílio na realização dos experimentos *in vivo*.

Ao prof. Álvaro Vianna Teixeira da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio na realização dos experimentos de espalhamento de luz estático.

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

Ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFMG pelo apoio e atenção, em especial a todos os profissionais da Secretária de Pós-Graduação em Química.

A todos os amigos do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais pelas indispensáveis ajudas e excelente convivência dentro e fora do ambiente de trabalho.

---

Ao prof. Dr. Ângelo Denadai, prof. Dr. Carlos Eduardo Jensen e Dr. Joel José Passos obrigada pela grande amizade, disponibilidade e atenção.

A toda minha família pelo constante incentivo, apoio e compreensão.

Ao João, companheiro acadêmico e de vida. Gostaria de compartilhar com você mais esse sonho realizado. Conquista obtida com o nosso esforço, empenho, dedicação e amor. Obrigada por dividir a vida comigo de uma maneira tão especial!

---

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<i>i</i>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<i>viii</i>
<b>ABREVIATURAS</b>	<i>x</i>
<b>RESUMO</b>	<i>xii</i>
<b>ABSTRACT</b>	<i>xiii</i>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Ciclodextrinas: estrutura, propriedades e aplicações</i>	<i>5</i>
1.2 <i>Materiais poliméricos e sistemas de liberação de fármacos</i>	<i>12</i>
1.3 <i>Eletrofiação</i>	<i>15</i>
1.4 <i>Objetivos</i>	<i>19</i>
1.4.1 <i>Objetivo geral</i>	<i>19</i>
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>19</i>
<b>CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
2.1 <i>Reagentes</i>	<i>22</i>
2.2 <i>Descrição dos experimentos</i>	<i>24</i>
2.2.1 <i>Preparo do composto de inclusão de cloridrato de propranolol e <math>\beta</math>-ciclodextrina</i>	<i>24</i>
2.2.2 <i>Determinação dos parâmetros físico-químicos de interação do sistema PROP:<math>\beta</math>CD</i>	<i>24</i>
2.2.3 <i>Avaliação do tamanho dos agregados moleculares do sistema PROP:<math>\beta</math>CD</i>	<i>24</i>
2.2.4 <i>Avaliação da massa molecular dos agregados moleculares do sistema PROP:<math>\beta</math>CD</i>	<i>25</i>
2.2.5 <i>Síntese de polímeros a base de <math>\beta</math>-ciclodextrina</i>	<i>25</i>

---

<i>2.2.6 Determinação da massa molar ponderal média, raio de giro e segundo coeficiente do virial para poliβCD sintetizada</i>	26
<i>2.2.7 Determinação da citotoxicidade da poliβCD sintetizada</i>	27
<i>2.2.8 Preparação das fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais de cloridrato de propranolol em matriz de PMAA e poliβCD</i>	28
<i>2.2.9 Estudo da cinética de liberação in vitro para as fibras poliméricas uniaixias e coaxiais de cloridrato de propranolol em matriz de PMAA e poliβCD</i>	29
<i>2.2.10 Preparação de fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA</i>	29
<i>2.2.11 Estudo da cinética de liberação in vitro para fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA</i>	30
<i>2.2.12 Determinação da viabilidade celular das fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA</i>	30
<i>2.2.13 Avaliação dos efeitos inflamatórios e anti-angiogênicos de fibras poliméricas de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA</i>	31
<i>2.3 Descrição das técnicas de caracterização</i>	33
<i>2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear</i>	33
<i>2.3.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica</i>	33
<i>2.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico</i>	34
<i>2.2.4 Espalhamento de Luz Estático</i>	34
<i>2.2.5 Espectrometria de Massas</i>	34
<i>2.2.6 Análise Térmica</i>	35
<i>2.2.7 Difração de Raios-X</i>	35
<i>2.2.8 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho</i>	35
<i>2.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	36
<i>2.2.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	36

---

2.2.11 Ângulo de Contato	36
2.2.12 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível	36
<b>CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistema supramolecular formado por cloridrato de propranolol e <math>\beta</math>-ciclodextrina</b>	38
3.1 Ressonância Magnética Nuclear	39
3.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica	47
3.3 Espectrometria de Massas	52
3.4 Espalhamento de luz dinâmico	55
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistemas de liberação de cloridrato de propranolol em matrizes poliméricas</b>	58
4.1 Síntese de polímeros a base de $\beta$ -ciclodextrina	59
4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear	62
4.1.2 Espalhamento de Luz Estático	64
4.1.3 Difração de raios-X	66
4.1.4 Análise Térmica	67
4.1.5 Determinação da Viabilidade Celular	69
4.2 Preparação de fibras poliméricas contendo cloridrato de propranolol por eletrospinning	70
4.2.1 Preparação e caracterização de fibras poliméricas uniaxiais contendo cloridrato de propranolol	70
4.2.2 Preparação e caracterização de fibras poliméricas coaxiais contendo cloridrato de propranolol	88
4.3 Estudo da cinética de liberação <i>in vitro</i> de cloridrato de propranolol em matrizes de fibras poliméricas de PMAA e poli $\beta$ CD	94

---

<b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistemas de liberação de cloridrato de daunorubicina em matrizes poliméricas</b>	102
5.1 Preparação e caracterização de fibras poliméricas de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA	103
5.2 Estudo da cinética de liberação <i>in vitro</i> de cloridrato de daunorubicina em matriz de fibra polimérica de PLGA	110
5.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos, inflamatórios e anti-angiogênicos de fibras poliméricas de daunorubina em matriz de PLGA	113
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES</b>	118
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	121

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

<b>Figura 1.1</b> - Níveis de fármaco no plasma sanguíneo: (a) sistemas convencionais e (b) liberação controlada	2
<b>Figura 1.2</b> - Fórmula estrutural do cloridrato de propranolol	4
<b>Figura 1.3</b> - Fórmula estrutural do cloridrato de daunorubicina	4
<b>Figura 1.4</b> - Fórmula estrutural das ciclodextrinas naturais	6
<b>Figura 1.5</b> - Fórmula estrutural da ciclodextrina: (a) unidade glicosídica em conformação de cadeira e (b) representação da conformação de cone truncado	7
<b>Figura 1.6</b> - Representação esquemática do processo de auto-associação dos compostos supramoleculares	10
<b>Figura 1.7</b> - Representação esquemática: (a) poli-ciclodextrina linear e (b) poli-ciclodextrina globular	11
<b>Figura 1.8</b> - Unidade monomérica: (a) PLA, (b) PGA e (c) PLGA	14
<b>Figura 1.9</b> - Unidade monomérica do PMAA	14
<b>Figura 1.10</b> - Representação esquemática do equipamento de eletrofiação, cone de Taylor e fibras de PMAA obtidas por eletrofiação	16
<b>Figura 1.11</b> - Representação esquemática da preparação de fibras uniaxiais utilizando bico injetor de saída única e fibras coaxiais utilizando bicos injetores de saídas múltiplas	17
<b>Figura 1.12</b> - Ilustração esquemática do efeito da concentração da solução polimérica, razão de fluxo e campo elétrico na obtenção de fibras poliméricas por eletrofiação	18

---

## **CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

**Figura 2.1** - Reação entre ciclodextrina e epícloridrina para formação de estrutura macromolecular na qual a ciclodextrina compõem a estrutura principal da cadeia polimérica 26

## **CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistema supramolecular formado por cloridrato de propranolol e $\beta$ -ciclodextrina**

**Figura 3.1** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para a  $\beta\text{CD}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio 40

**Figura 3.2** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para o cloridrato de propranolol ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) 41

**Figura 3.3** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o sistema PROP: $\beta\text{CD}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) 42

**Figura 3.4** - Seção expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o sistema PROP: $\beta\text{CD}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) 43

**Figura 3.5** - Mapa de contorno 2D ROESY para o sistema PROP: $\beta\text{CD}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) 45

**Figura 3.6** - Seção expandida do mapa de contorno 2D ROESY para o sistema PROP: $\beta\text{CD}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) 46

**Figura 3.7** - Curvas de titulação calorimétrica para PROP ( $80 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em  $\beta\text{CD}$  ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) após subtração dos brancos, bem como para PROP em água e  $\beta\text{CD}$  em água: (a) 278,15; (b) 288,15; (c) 298,15; (d) 308,15; (e) 318,15 K 49

**Figura 3.8** - Parâmetros termodinâmicos de interação para o sistema cloridrato de propranolol em  $\beta$ -ciclodextrina: (a)  $\Delta G$ ; (b)  $\Delta H$ ; (c)  $T\Delta S$ ; (d)  $K_{\text{ass}}$ ; (e) estequiometria 50

**Figura 3.9** - Espectros de massa obtidos em fonte de ionização por eletrospray operando em modo positivo para: (a) o cloridrato de propranolol, (b)  $\beta$ -ciclodextrina e (c) composto de inclusão PROP: $\beta\text{CD}$  54

---

**Figura 3.10** - Distribuição da população de agregação para a titulação de PROP em  $\beta$ CD, PROP em água e  $\beta$ CD em água: razão molar 0,09 a 1,76 (a), (d), (g); razão molar 8,80 a 13,03 (b), (e), (h); razão molar 20,52 a 22,62 (c), (f), (i) 56

**CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistemas de liberação de cloridrato de propranolol em matrizes poliméricas**

**Figura 4.1** - Representação esquemática de formação da poli $\beta$ CD por policondensação utilizando epícloridrina como agente de acoplamento 60

**Figura 4.2** - Mecanismo geral proposto para a obtenção de poli $\beta$ CD a partir de  $\beta$ CD e epícloridrina em meio fortemente alcalino 61

**Figura 4.3** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) para: (a) poli $\beta$ CD e (b)  $\beta$ CD 63

**Figura 4.4** - (a) Diferença de índice de refração em função da concentração para a poli $\beta$ CD e (b) gráfico de Zimm para a poli $\beta$ CD com concentrações variando entre 1,48 a 4,76 g mL $^{-1}$  e faixa angular de 30 a 110° 65

**Figura 4.5** - Difrátogramas de raios-X de pó para poli $\beta$ CD e  $\beta$ CD obtidos em tubo de cobre utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,54051$  67

**Figura 4.6** - (a) Curvas TG para a poli $\beta$ CD e para a  $\beta$ CD em atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  e (b) curvas DTG para a poli $\beta$ CD e para a  $\beta$ CD 68

**Figura 4.7** - (a) Curvas DTA para a poli $\beta$ CD e  $\beta$ CD e (b) curva DSC para a poli $\beta$ CD em atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$  68

**Figura 4.8** - Porcentagem de viabilidade de fibroblastos tratados com soluções de poli $\beta$ CD com concentrações de 10.000 a 1,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  por 48 horas 69

**Figura 4.9** - Micrografias de fibras uniaxiais obtidas por eletrofiação com magnificação de 10.000x: (a) PMAA; (b) PMAA + PROP; (c) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20); (d) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP; (e) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) e (f) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) + PROP 72

<b>Figura 4.10</b> - Esquema para formação de ligações cruzadas entre o PMAA e a poliβCD induzidas por aquecimento	74
<b>Figura 4.11</b> - Micrografias de fibras uniaxiais obtidas por eletrospinação com magnificação de 10.000x após tratamento térmico: (a) PMAA; (b) PMAA + PROP; (c) blenda PMAA:poliβCD (80:20); (d) blenda PMAA:poliβCD (80:20) + PROP; (e) blenda PMAA:poliβCD (60:40) e (f) blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP	75
<b>Figura 4.12</b> - Espectros de absorção na região do infravermelho para PMAA, poliβCD e PROP	77
<b>Figura 4.13</b> - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras PMAA antes e após tratamento térmico; fibras PMAA + PROP antes e após tratamento térmico	79
<b>Figura 4.14</b> - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras da blenda PMAA:poliβCD (80:20) antes e após tratamento térmico; fibras da blenda PMAA:poliβCD (80:20)+ PROP antes e após tratamento térmico	81
<b>Figura 4.15</b> - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras da blenda PMAA:poliβCD (60:40) antes e após tratamento térmico; fibras blenda da PMAA:poliβCD (60:40) + PROP antes e após tratamento térmico	83
<b>Figura 4.16</b> - Curvas TG e DTG em atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> : (a) e (b) PROP, PMAA e poliβCD; (c) e (d) fibras uniaxiais sem adição de PROP; (e) e (f) fibras uniaxiais com adição de PROP	84
<b>Figura 4.17</b> - Curvas DTA em atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> : (a) PROP, PMAA e poliβCD; (b) fibras uniaxiais sem adição de PROP; (c) fibras uniaxiais com adição de PROP	86
<b>Figura 4.18</b> - Ângulo de contato das gotas de água em função do tempo nas superfícies das fibras após realização de tratamento térmico: (a) PMAA + PROP, (b) blenda PMAA:poliβCD (80:20) + PROP e (c) blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP	88

---

<b>Figura 4.19</b> - Micrografias de fibras coaxiais obtidas por eletrofiação com magnificação de 10.000x: (a) PMAA(poli $\beta$ CD); (b) PMAA(poli $\beta$ CD + PROP)	89
<b>Figura 4.20</b> - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para as fibras coaxiais: (a) magnificação de 10.000x e (b) magnificação de 230.000x	90
<b>Figura 4.21</b> - Micrografias de fibras coaxiais obtidas por eletrofiação após aquecimento com magnificação de 10.000x: (a) PMAA(poli $\beta$ CD); (b) PMAA(poli $\beta$ CD + PROP)	91
<b>Figura 4.22</b> - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras coaxiais	92
<b>Figura 4.23</b> - Curvas TG e DTG em atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> : (a) e (b) PROP, PMAA e poli $\beta$ CD; (c) e (d) fibras coaxiais sem e com adição de PROP	93
<b>Figura 4.24</b> - Curvas DTA em atmosfera dinâmica N <sub>2</sub> : (a) PROP, PMAA e poli $\beta$ CD; (b) fibras coaxiais sem e com adição de PROP	94
<b>Figura 4.25</b> - Curvas de porcentagem de liberação cumulativa de cloridrato de propranolol disperso em fibras uniaxiais e coaxiais de PMAA e poli $\beta$ CD	95
<b>Figura 4.26</b> - Micrografias de fibras uniaxiais antes e após 168 horas de liberação in vitro de cloridrato de propranolol com magnificação de 5000x: (a) e (c) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP; (b) e (d) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) + PROP	97
<b>Figura 4.27</b> - Micrografias de fibras coaxiais antes e após 168 horas de liberação in vitro de cloridrato de propranolol com magnificação de 5000x: (a) antes da liberação (b) após 168 horas de liberação	98

---

**CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistemas de liberação de cloridrato de daunorubicina em matrizes poliméricas**

- Figura 5.1** - *Imagens de microscopia: (a) MEV para as fibras de PLGA com magnificação de 10.000x, (b) MEV para as fibras de PLGA-DNR com magnificação de 10.000x, microscopia de fluorescência confocal para as fibras de PLGA com magnificação de 63x e (d) microscopia de fluorescência confocal para as fibras de PLGA-DNR com magnificação de 63x* 104
- Figura 5.2** - *Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros* 105
- Figura 5.3** - *Difratogramas de raios-X para as fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros obtidos em tubo de cobre utilizando radiação  $CuK\alpha = 1,54051$*  108
- Figura 5.4** - *Curvas TG e DTG para as fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros obtidas em atmosfera dinâmica de  $N_2$*  109
- Figura 5.5** - *(a) Curvas DTA para as fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros e (b) Curvas DSC para fibras de PLGA e de PLGA-DNR obtidas em atmosfera dinâmica de  $N_2$*  110
- Figura 5.6** - *Curvas de porcentagem de liberação cumulativa de cloridrato de daunorubicina dispersa em fibras de PLGA (a) porcentagem de liberação cumulativa até 1224 horas, (b) porcentagem de liberação cumulativa até 8 horas, (c) porcentagem de liberação cumulativa entre 8 a 624 horas e (d) porcentagem de liberação cumulativa entre 624 a 1224 horas* 111
- Figura 5.7** - *Curvas de porcentagem de liberação cumulativa de cloridrato de daunorubicina dispersa em fibras de PLGA (a) porcentagem de liberação cumulativa até 1224 horas, (b) porcentagem de liberação cumulativa até 8 horas, (c) porcentagem de liberação cumulativa entre 8 a 624 horas e (d) porcentagem de liberação cumulativa entre 624 a 1224 horas* 114

---

**Figura 5.8** - Níveis de acumulação de neutrófilos e macrófagos para as fibras de PLGA-DNR, PLGA e DNR livre mensurados através de atividade de: (a) MPO e (b) NAG 116

**Figura 5.9** - Níveis de acumulação: (a) Hb e (b) VEGF para as fibras de PLGA, PLGA-DNR e DNR livre 117

---

## ÍNDICE DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

<b>Tabela 1.1</b> - Propriedades físico-químicas da $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ ciclodextrina	6
<b>Tabela 1.2</b> - Polímeros sintéticos utilizados em sistemas de liberação de fármacos	13

### **CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistema supramolecular formado por cloridrato de propranolol e $\beta$ -ciclodextrina**

<b>Tabela 3.1</b> - Valores de deslocamento químico ( $\delta$ /ppm) para os hidrogênios da $\beta$ CD ( $D_2O$ , 400 MHz)	39
<b>Tabela 3.2</b> - Valores de deslocamento químico ( $\delta$ /ppm) para os hidrogênios do cloridrato de propranolol ( $D_2O$ , 400 MHz)	41
<b>Tabela 3.3</b> - Valores de deslocamento químico ( $\delta$ /ppm) para os hidrogênios do cloridrato de propranolol puro e na presença de $\beta$ CD ( $D_2O$ , 400 MHz)	44

### **CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistemas de liberação de cloridrato de propranolol em matrizes poliméricas**

<b>Tabela 4.1</b> - Valores de massa molar ponderal média ( $M_w$ ), segundo coeficiente do viral ( $A_2$ ) e raio de giro ( $R_g$ ) para a poli $\beta$ CD obtidos por espalhamento de luz estático	66
<b>Tabela 4.2</b> - Citotoxicidade de compostos em função da porcentagem de viabilidade celular	70
<b>Tabela 4.3</b> - Diâmetro das fibras uniaxiais de PMAA e poli $\beta$ CD preparadas por eletrofiação	73
<b>Tabela 4.4</b> - Relação dos principais modos vibracionais da molécula de cloridrato de propranolol	76
<b>Tabela 4.5</b> - Diâmetro das fibras coaxiais de PMAA e poli $\beta$ CD preparadas por eletrofiação	89

---

**Tabela 4.6** - Parâmetros obtidos na modelagem da cinética de liberação de cloridrato de propranolol a partir das fibras uniaxiais e coaxiais de PMAA e poli $\beta$ CD 100

**CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO: Sistemas de liberação de cloridrato de daunorubicina em matrizes poliméricas**

**Tabela 5.1** - Relação dos principais modos vibracionais da molécula de cloridrato de daunorubicina 106

**Tabela 5.2** - Coeficientes de regressão ( $R^2$ ) obtidos na modelagem da cinética de liberação de cloridrato de daunorubicina em matrizes de fibras de PLGA 112

---

## ABREVIATURAS

$\alpha$ CD:  $\alpha$ -ciclodextrina

$\beta$ CD:  $\beta$ -ciclodextrina

$\gamma$ CD:  $\gamma$ -ciclodextrina

$\delta$ : Deslocamento químico

$\Delta G$ : Variação da energia livre de Gibbs

$\Delta H$ : Variação de entalpia

$\Delta S$ : Variação de entropia

$^{13}\text{C}$ : Espectro de ressonância magnética de carbono 13

$^1\text{H}$ : Espectro de ressonância magnética de hidrogênio

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMBC: Heteronuclear multiple bond coherence

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

$^1\text{H}/^1\text{H}$  2D NOESY: Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

$^1\text{H}/^1\text{H}$  ROESY: Rotating frame Overhauser effect spectroscopy

$A_2$ : Segundo coeficiente do Virial

C: Concentração

DLS: Espalhamento de luz dinâmico

DMF: Dimetilformamida

DNR: Cloridrato de daunorubicina

$dn/dc$ : Incremento do índice de refração em função da concentração de soluto

DEPT: Distortionless enhancement by polarization transfer

DQ-UFMG: Departamento de Química da UFMG

DRX: Difração de raios-X

DTG: Termogravimetria derivada

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

DTA: Análise Térmica Diferencial

ESI-MS: Espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray

EP: Epicloridrina

FTIR-ATR: Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por reflectância total atenuada

Hb: Hemoglobina

ITC: Calorimetria de titulação isotérmica

$K_{ass}$ : Constante de associação

---

*K: Constate Óptica*

*M<sub>w</sub>: Massa molar ponderal média*

*MPO: Mieloperoxidase*

*MET: Microscopia eletrônica de transmissão*

*MEV: Microscopia eletrônica de varredura*

*MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-(difeniltetrazol)*

*N<sub>A</sub>: Número de Avogadro*

*n<sub>o</sub>: Índice de refração do solvente*

*NAG: N-acetil-β-D-glucosaminidase*

*PMAA: Poli(ácido metacrílico)*

*poliβCD: Poli-βciclodextrina*

*PROP: Cloridrato de propranolol*

*R<sub>θ</sub>: Razão de Rayleigh*

*R<sub>g</sub>: Raio de giro*

*RMN: Ressonância magnética nuclear*

*SLS: Espalhamento de luz estático*

*TG: Termogravimetria*

*UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais*

*UFV: Universidade Federal de Viçosa*

*UNIFEI: Universidade Federal de Itajubá*

*VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial*

---

## RESUMO

### **Título: Estudo de sistemas supramoleculares a base de ciclodextrinas e nanofibras de polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de fármacos**

No presente trabalho foram obtidos sistemas supramoleculares envolvendo  $\beta$ -ciclodextrina, bem como sistemas de liberação de fármacos hidrofílicos na forma de fibras nanométricas utilizando polímeros à base de  $\beta$ -ciclodextrina associados a outros polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Inicialmente foi estudada e caracterizada a formação do composto de inclusão entre o cloridrato de propranolol, fármaco anti-hipertensivo, e a  $\beta$ -ciclodextrina em solução, bem como seu processo de auto-associação. Os nanoagregados formados possuem dimensões da ordem de 220 a 300 nm. Os parâmetros termodinâmicos de formação evidenciaram um processo espontâneo e dependente da temperatura. Os coeficientes estequiométricos aumentam com a elevação da temperatura obtendo-se nanoagregados 4:1 (cloridrato de propranolol:  $\beta$ -ciclodextrina) a temperatura de 318,15 K.

O segundo sistema de liberação controlada obtido utilizando cloridrato de propranolol foram as nanofibras poliméricas uniaxiais e coaxiais com base no polímero de  $\beta$ -ciclodextrina (poli $\beta$ CD) e PMAA. Foram avaliadas suas propriedades estruturais, térmicas e morfológicas buscando-se estabelecer correlações de estrutura-propriedade físico-químicas e biológicas. Os dois arranjos de fibras influenciaram de forma direta a liberação *in vitro* do fármaco. O efeito de explosão do fármaco foi drasticamente modulado nas fibras coaxiais, sendo 44 % menor em 8 h quando comparado às fibras uniaxiais. Assim, o arranjo coaxial é uma estratégia alternativa para a liberação do cloridrato de propranolol.

O terceiro sistema de liberação controlada desenvolvido foram as nanofibras poliméricas uniaxiais de PLGA contendo o cloridrato de daunorubicina, quimioterápico de uso em clínica. Foi observado efeito de explosão de cerca de 65 % da quantidade de fármaco em 8 h seguido por uma progressiva e lenta liberação do fármaco. Resultados *in vitro* demonstraram que as nanofibras contendo cloridrato de daunorubicina apresentaram maior efeito citotóxico frente a células tumorais A431 quando comparadas ao fármaco livre. Experimentos *in vivo* revelaram que as nanofibras apresentaram maior efeito anti-angiogênico, com diminuição da vascularização não demonstrando potencial inflamatório, sugerindo um sistema alternativo para liberação de daunorubicina.

**Palavras chave:** Ciclodextrinas, fibras poliméricas, sistemas de liberação de fármacos, cloridrato de propranolol, cloridrato de daunorubicina.

---

## ABSTRACT

### **Title: Study of the supramolecular systems based on cyclodextrins and biodegradable polymer nanofibers for drugs controlled release**

In this work supramolecular system involving  $\beta$ -cyclodextrin and drug delivery systems of hydrophilic drugs based on polymer nanofibers containing poly- $\beta$ -cyclodextrin combined with other biocompatible polymers were obtained.

Initially, the formation of inclusion compound between propranolol hydrochloride, an antihypertensive drug, and  $\beta$ -cyclodextrin was studied in solution, as well as its self-assembly process. These nanoaggregates possess sizes ranging from 220 to 300 nm. The thermodynamic parameters of nanoaggregates formation showed a spontaneous and temperature dependent process. The stoichiometric coefficients increase with temperature rise reaching structural arrangements consisting of 4:1 (propranolol hydrochloride: $\beta$ -cyclodextrin) at 318.15 K.

The second delivery system obtained using propranolol hydrochloride were uniaxial and coaxial polymeric nanofibers based on  $\beta$ -cyclodextrin polymer (poly $\beta$ CD) and PMAA. Their structural, thermal and morphological properties were evaluated seeking to establish correlations of physical-chemical and biological structure-property. These two fiber arrangements have a direct influence in drug release. The burst effect was dramatically modulated into the coaxial fibers, 44 % lower than uniaxial fibers in 8 h. Thus, the coaxial arrangement is an alternative strategy for the release of propranolol hydrochloride.

The third delivery system developed were the uniaxial polymeric nanofibers based on PLGA containing the daunorubicin hydrochloride, chemotherapy for clinical use. The burst effect of about 65 % of the amount of drug present in the fiber at 8 h was observed followed by a slow and gradual release of the drug. The *in vitro* results have shown that the nanofibers containing daunorubicin hydrochloride showed higher cytotoxic effect against A431 tumor cells when compared to the free drug. *In vivo* experiments revealed that the nanofibers containing the drug showed greater anti-angiogenic effect, with reduced vasculature and not showing inflammatory potential, suggesting an alternative system for release of daunorubicin.

**Keywords:** Cyclodextrin, polymer fibers, drug delivery systems, propranolol hydrochloride, daunorubicin hydrochloride.

# ***CAPÍTULO 1***

## ***Introdução***

---

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas degenerativas são hoje a principal causa de morte e incapacidade em todo o mundo. Estimativas recentes apontam que doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças respiratórias obstrutivas serão responsáveis por mais de três quartos das mortes no ano de 2030 [1]. Apesar de existirem terapias de combate, a prevalência de tais doenças é crescente e as projeções são uma indicação clara de que maiores avanços são necessários para o desenvolvimento de novas formas de tratamento [2-4].

Uma das estratégias para estabelecer alternativas terapêuticas que possibilitem administrar fármacos já utilizados na clínica médica com maior segurança e eficácia são os sistemas de liberação controlada de fármacos. Tais sistemas têm por objetivo controlar a velocidade de liberação do fármaco por um período maior de tempo, utilizando-se uma administração para manter a faixa de ação terapêutica [5].

Em sistemas de administração de fármacos convencionais a concentração do ativo pode exceder níveis tóxicos além da janela terapêutica seguida por uma diminuição ao longo do tempo a um nível sub-terapêutico. Sendo assim, os níveis plasmáticos são dependentes da frequência das dosagens administradas. A diferença da variação de concentração plasmática efetiva em função do tempo entre sistemas convencionais e de liberação controlada pode ser visualizada na Figura 1 [6, 7]. Estudos têm demonstrado que sistemas de liberação controlada são capazes de manter o nível terapêutico com a liberação progressiva do fármaco, reduzir efeitos adversos e tóxicos com conseqüente diminuição do número de administrações e, dessa forma, contribuir para maior adesão ao tratamento e melhor qualidade de vida do paciente [8, 9].

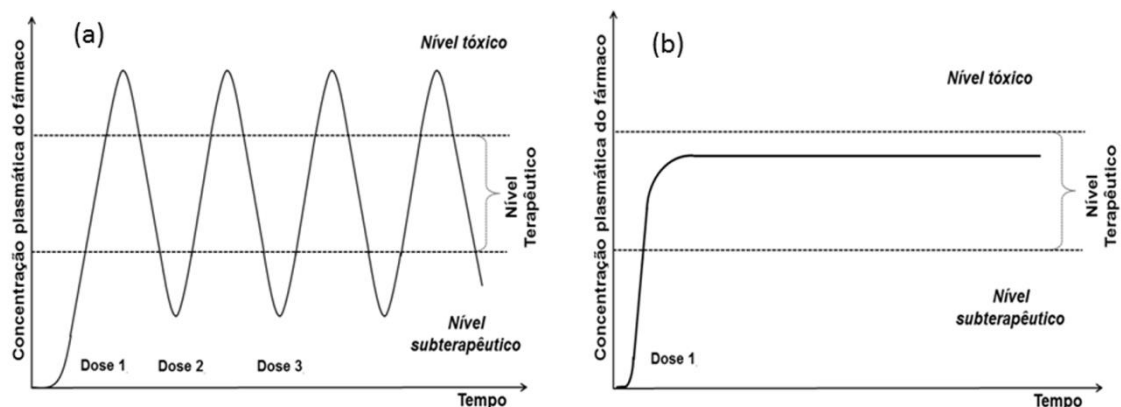


Figura 1.1 - Níveis de fármaco no plasma sanguíneo: (a) sistemas convencionais e (b) liberação controlada.

Um sistema de liberação de fármacos ideal deve possuir o maior número possível das características citadas abaixo [10]:

- O fármaco encapsulado deve permanecer quimicamente estável na matriz de liberação, característica essencial para maximizar a eficácia terapêutica e diminuir os efeitos adversos;
- Responder a estímulos: a estabilidade do fármaco é necessária, mas uma vez no sítio de ação, este deve ser liberado;
- Direcionamento passivo: aspecto chave para tratamento de muitas doenças, como o câncer. De acordo com as dimensões do sistema ele pode permear de forma passiva pelos tecidos e acumular-se no sítio de ação;
- Direcionamento ativo: o sistema pode possuir ligantes superficiais que o direcionam para o sítio de ação. O sucesso para essa estratégia está na seleção dos ligantes que devem ter alta especificidade e afinidade com as células doentes para que apenas essas possam captá-lo;
- Toxicidade: o sistema não deve ser tóxico e deve gerar produtos de degradação que possam ser metabolizados pelo organismo;
- Facilidade para obtenção: importante aspecto para investigação laboratorial e crucial para produção em escala industrial.

O controle da liberação de fármacos hidrofílicos em sistemas formados por diversas matrizes ainda é um grande desafio, pois geralmente obtém-se baixas taxas de incorporação e a distribuição superficial ocasiona rápida difusão no meio, levando a liberação de grande porcentagem de ativo. Dessa forma, a obtenção de sistemas que aperfeiçoem a liberação destes fármacos é de grande relevância [11]. O cloridrato de propranolol (PROP) e o cloridrato de daunorubicina (DNR) são fármacos já utilizados na clínica médica para o tratamento de doenças cardiovasculares e câncer, respectivamente. São fármacos altamente solúveis em água, um dos fatos que fazem destes excelentes modelos para serem investigados na preparação de sistemas de liberação de fármacos.

O cloridrato de propranolol (PROP), Figura 1.2, é um beta bloqueador não seletivo utilizado no tratamento da hipertensão, angina pectoris e arritmias cardíacas. O PROP é bem absorvido no trato gastrointestinal, mas possui baixa biodisponibilidade oral (15 - 23 %) devido ao extenso metabolismo de primeira passagem. Além disso, o PROP possui propriedades físico-químicas como alta solubilidade em água ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ), curto tempo de meia vida (3 - 5 horas) e baixo peso molecular ( $295,81 \text{ g mol}^{-1}$ ) que fazem deste fármaco um candidato a incorporação em sistemas de liberação que usem outras rotas de administração diferentes da oral [12].

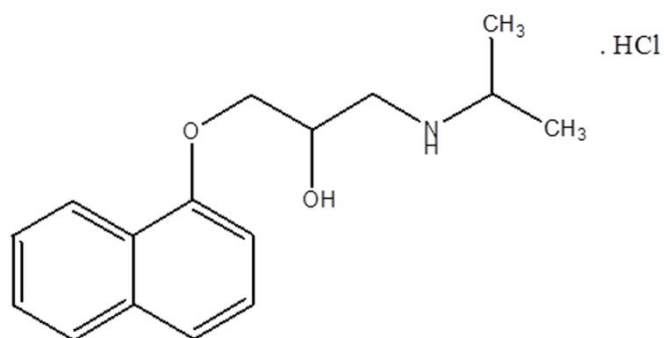


Figura 1.2 - Fórmula estrutural do cloridrato de propranolol.

O cloridrato de daunorubicina (DNR), Figura 1.3, é um fármaco antitumoral da classe das antracilinas, classe esta que é uma das mais comuns utilizadas como arsenal quimioterapêutico. A DNR possui como propriedades físico-químicas a alta solubilidade em água ( $39 \text{ mg mL}^{-1}$ ), tempo de meia-vida de 18,5 horas e peso molecular de  $527,52 \text{ g mol}^{-1}$ . Sua ação sobre as células depende da interação com a *DNA polimerase*, inibindo o crescimento de células normais e cancerígenas ao mesmo tempo [13]. Devido a esta falta de seletividade, a sua incorporação em sistemas de liberação de fármacos que possam ser utilizados em regiões localizadas do organismo que apresentem tumores pode maximizar sua ação e reduzir efeitos adversos.

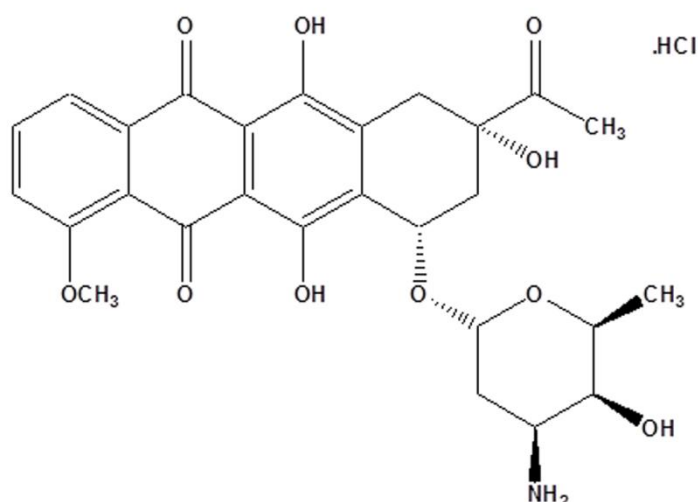


Figura 1.3 - Fórmula estrutural do cloridrato de daunorubicina.

Os sistemas de liberação de fármacos mudaram a economia associada ao desenvolvimento de novos produtos. Atualmente, os custos requeridos para o desenvolvimento de um novo fármaco são estimados em 500 milhões de dólares em um tempo aproximado de 10 anos, existindo ainda, uma grande possibilidade de falhas nas últimas etapas dos testes clínicos. Ao passo que, um fármaco já empregado na clínica médica utilizado em uma nova formulação de liberação controlada apresenta custos significativamente menores, da ordem de 20 - 50 milhões de dólares em cerca de 3 - 4 anos. Assim, estes sistemas não só aperfeiçoam a eficácia terapêutica do fármaco beneficiando milhões de pacientes, como também são importantes estratégias econômicas para as companhias farmacêuticas no desenvolvimento de novos produtos [14]. Por estas razões, o mercado mundial de sistemas de liberação de fármacos está em franco crescimento, sendo estimado em 53 bilhões de dólares em 2009, podendo chegar a 136 bilhões de dólares em 2021 [15].

A nanotecnologia tem desempenhado um importante papel em aplicações biomédicas para o aprimoramento de sistemas de liberação de fármacos, pois devido às pequenas dimensões observa-se uma melhor permeabilidade dos fármacos nos sítios de ação e o aperfeiçoamento do processo de liberação. Além disso, esses dispositivos em dimensões nanométricas podem contribuir de forma eficaz para: a liberação de macromoléculas em sítios intracelulares, direcionamento de moléculas a regiões específicas do organismo e sistemas multifuncionais de diagnóstico e tratamento [16].

O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas que tem por objetivo a obtenção de sistemas de liberação de fármacos tem impulsionado o estudo de diversos materiais de grande interesse tecnológico, dentre eles podem ser citados: compostos de inclusão com ciclodextrinas (sistemas supramoleculares do tipo hóspede-hospedeiro), lipossomas, micelas, e ainda, sistemas poliméricos [17, 18].

### **1.1 Ciclodextrinas: estrutura, propriedades e aplicações**

As ciclodextrinas (CDs) constituem uma família de oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de D-glicose que são unidas por ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$  e são obtidas atualmente a partir da degradação do amido pela ação da enzima *glicosiltransferase*. As CDs de ocorrência natural mais comuns possuem 6, 7 ou 8 unidades de glicose e são denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente, conforme apresentado na Figura 1.4. A diferença estrutural dessas ciclodextrinas, embora seja de apenas uma unidade de glicose, confere a essas macroestruturas propriedades particulares conforme listado na Tabela 1.1[19].

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrina.

	$\alpha$ CD	$\beta$ CD	$\gamma$ CD
Número de monômeros de glicose	6	7	8
Massa molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C ( $\text{g L}^{-1}$ )	145,0	18,5	232,0
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 - 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Altura (Å)	7,9	7,9	7,9

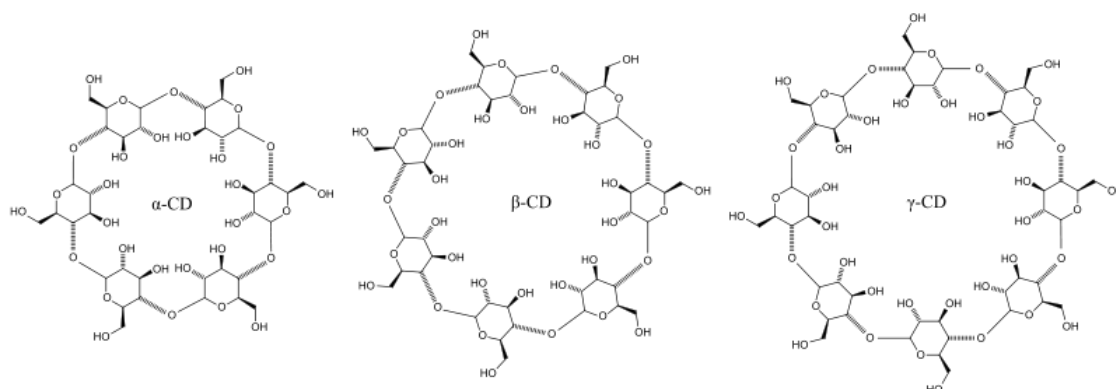
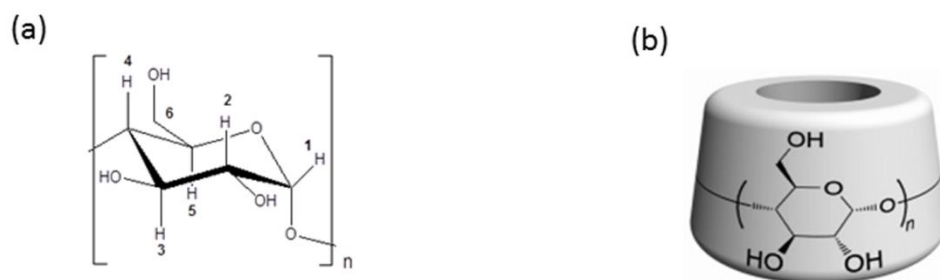


Figura 1.4 - Fórmula estrutural das ciclodextrinas naturais.

As características estruturais das ciclodextrinas foram definidas após estudos de cristalografia de raios-X e de ressonância magnética nuclear, demonstrando que sua estrutura é equivalente a um cone truncado, fato ocasionado pela ausência de livre rotação das ligações glicosídicas e conformação em forma de cadeira das unidades de glicose. Na conformação de cone truncado os grupos hidroxila permanecem orientados para o exterior do cone estando os grupos OH primários localizados na extremidade mais estreita, ligados aos carbonos C6. Os grupos OH secundários estão localizados na extremidade mais larga do cone, ligados aos átomos de carbonos C2 e C3, Figura 1.5. A disposição dos grupos hidroxila confere um caráter hidrofílico à região externa das moléculas de ciclodextrina devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o solvente [20].



**Figura 1.5 - Fórmula estrutural da ciclodextrina: (a) unidade glicosídica em conformação de cadeira e (b) representação da conformação de cone truncado.**

A ocorrência de ligações intramoleculares estabelecidas entre as hidroxilas secundárias é responsável pela variação de solubilidade em água observada para as CDs conforme apresentado na Tabela 1.1. Na  $\beta$ CD todas as possíveis ligações de hidrogênio ocorrem e a rigidez do anel macrocíclico reduz a solubilidade da mesma. Para a  $\alpha$ CD somente quatro das seis possíveis ligações de hidrogênio ocorrem, uma vez que uma unidade de glicose encontra-se em posição distorcida. Sendo assim, é observada maior solubilidade em água quando comparada à  $\beta$ CD. Finalmente, a  $\gamma$ CD apresenta a maior solubilidade entre as três ciclodextrinas, pois possui a estrutura mais flexível [21].

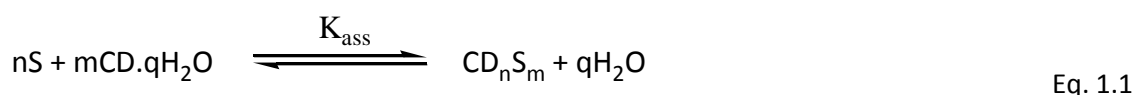
O interior da cavidade das ciclodextrinas é delimitado pelo alinhamento dos átomos de hidrogênio (H3 e H5) e átomos de oxigênios provenientes das ligações glicosídicas (C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), o que propicia características mais hidrofóbicas a essa região da molécula quando comparada à região externa. Assim, as ciclodextrinas são capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo de encapsular total ou parcialmente moléculas convidadas no interior de sua cavidade formando sistemas supramoleculares [21].

A Química Supramolecular tem sido descrita como “a Química além da molécula”, [22] na qual os componentes são mantidos unidos em arranjos organizados através de interações não covalentes do tipo van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas para formar compostos supramoleculares e, ainda em alguns casos, agregados moleculares [23, 24]. A obtenção de supermoléculas com propriedades e funcionalidades desejadas tem sido alvo de intensos estudos com abordagem centrada na Química Supramolecular [25] e as ciclodextrinas constituem blocos de construção muito versáteis que têm desempenhado importante papel no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos através da formação de sistemas do tipo hóspede-hospedeiro, denominados compostos de inclusão, bem como de agregados moleculares [26].

As ciclodextrinas são extensamente utilizadas na indústria farmacêutica devido a sua biocompatibilidade e habilidade de modificar propriedades dos fármacos através da formação dos compostos de inclusão. O processo de encapsulamento ou associação de fármacos com essas macromoléculas tem como propósito modificar o mecanismo de liberação da molécula hóspede, prolongando seu período de ação e ainda favorecendo seu direcionamento até o alvo de interesse. Assim, a inclusão pode levar ao aumento da estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos incluídos. Além disso, a possibilidade do fármaco atingir especificamente o ponto de interesse do organismo pode aperfeiçoar sua eficiência, culminando, por exemplo, em uma redução dos efeitos colaterais pré-existentes [27-29]. A toxicidade das CDs depende da via de administração utilizada e os efeitos tóxicos podem ser eliminados ou reduzidos pela seleção da ciclodextrina apropriada ao uso pretendido [30].

Para que o composto de inclusão seja formado dois importantes fatores devem ser levados em consideração: o primeiro está associado à existência de compatibilidade dimensional entre a molécula hóspede e a cavidade da ciclodextrina, ou seja, o tamanho e a geometria da molécula a ser incluída na cavidade da CD devem ser adequados para que haja efetiva acomodação da espécie. O segundo fator está relacionado com as interações termodinâmicas existentes entre os componentes do sistema que devem ser energeticamente favoráveis para que a encapsulação ocorra [19].

A formação dos compostos de inclusão em solução aquosa ocorre através de um processo em que as moléculas de água localizadas no interior da cavidade do macrociclo são substituídas pela molécula hóspede, que interagem frequentemente com a cavidade da CD, através sua região hidrofóbica [31]. Assim, a força motriz para o processo de encapsulação é a saída das moléculas de água da cavidade, uma vez que essas estão em um microambiente energeticamente desfavorável, podendo ser substituídas por moléculas hóspedes menos polares [21]. O processo de formação dos compostos de inclusão pode ser descrito pela Equação 1.1 e 1.2, sendo  $S$  a molécula hóspede;  $CD$  a ciclodextrina;  $CD_nS_m$  o composto de inclusão. Os índices estequiométricos da reação são representados por  $n$ ,  $m$ ,  $q$ . A constante de equilíbrio, denominada constante de associação, é dada por  $K_{ass}$  [32].



Ou de forma resumida:



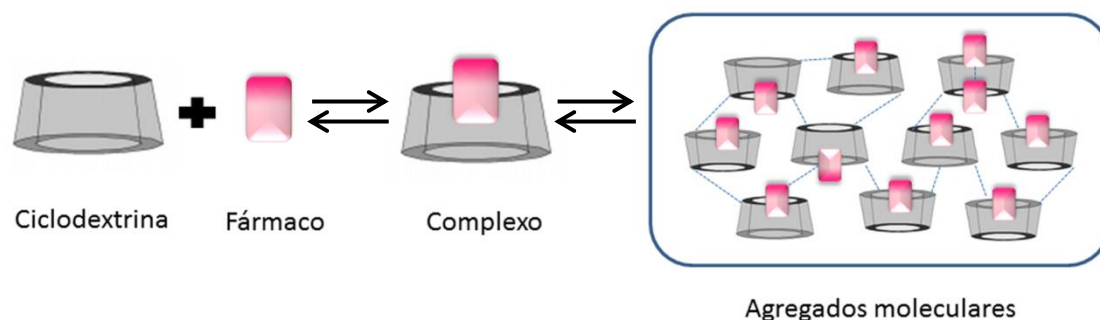
A constante de associação pode ser representada pela Equação 1.3 abaixo:

$$K_{ass} = \frac{[CD_nS_m]}{[S]^n [CD]^m} \quad \text{Eq. 1.3}$$

Conforme descrito nas Equações acima, se pode observar o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico entre a forma livre do fármaco e da ciclodextrina com o composto de inclusão. Após a administração do composto de inclusão no organismo, sua dissociação conduz à liberação do fármaco. Tal fato é mediado por efeitos de diluição, substituição competitiva de outras substâncias hidrofóbicas presentes no corpo e ainda pela degradação da ciclodextrina no cólon quando esta é administrada por via oral [33].

A extensão da complexação é mensurada pela constante de formação do composto  $K_{ass}$ , a qual estabelece o grau de afinidade entre o fármaco e a cavidade da CD [29]. Nesse contexto, é de extrema relevância a determinação da constante de associação do sistema em estudo, bem como dos parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo para que se compreendam os mecanismos de associação entre fármacos e ciclodextrinas e, assim avaliar sua real aplicabilidade farmacêutica.

Outra importante estratégia utilizada no desenvolvimento de sistemas sofisticados de liberação de fármacos está relacionada à capacidade das ciclodextrinas e compostos de inclusão se auto-associarem em solução sob diferentes condições para formar agregados moleculares, como demonstrado na Figura 1.6 [33-36]. A concepção e preparação de dispositivos nanométricos com tamanho e forma controlada é um desafio para a ciência supramolecular que utiliza a auto-associação como uma ferramenta poderosa para construção de estruturas complexas, as quais não poderiam ser sintetizadas por métodos convencionais. Assim, a associação espontânea de moléculas como as ciclodextrinas, é uma técnica promissora para a construção de estruturas com propriedades desejadas [26, 37, 38].



**Figura 1.6 - Representação esquemática do processo de auto-associação dos compostos supramoleculares.**

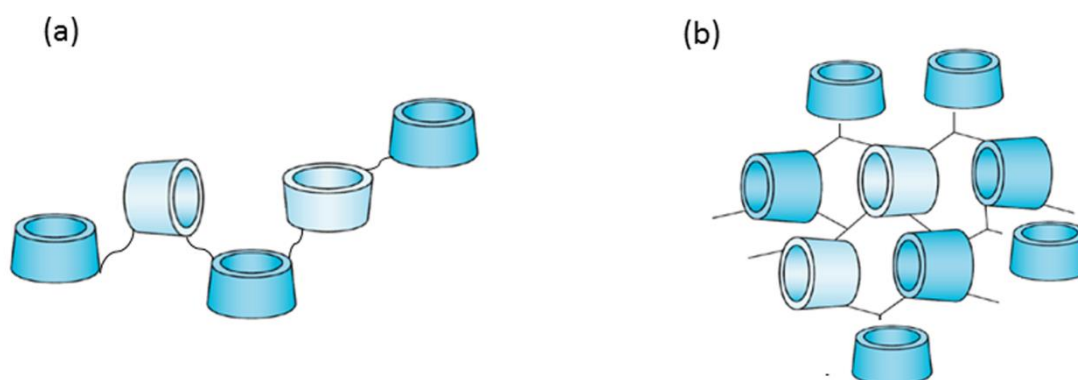
Embora as CDs tenham sido descobertas a mais de 100 anos, a primeira evidência experimental que sugeriu a tendência de auto-associação foi descrita por Miyajima *et al.* (1983 e 1986). Nos últimos anos as investigações sobre a formação de agregados de ciclodextrinas naturais e modificadas se intensificaram com os recentes avanços nas metodologias analíticas de detecção, tais como as microscopias eletrônicas e técnicas de espalhamento de luz [36, 39-41].

Estudos têm mostrado que os agregados de fármaco/ciclodextrinas são efetivos para solubilizar moléculas hidrofóbicas. O tamanho dos agregados formados varia em função das condições do meio e pode resultar em opalescência da solução, ou em muitos casos, como o diâmetro é muito menor que o comprimento de onda da luz visível, soluções transparentes são observadas [42-44]. Os mecanismos de agregação a nível molecular ainda não estão completamente elucidados, contudo, sabe-se que as forças que governam sua formação são o resultado de um delicado balanço entre forças atrativas e repulsivas que são fortemente influenciadas pela concentração de fármaco e ciclodextrinas, eficiência de encapsulação, habilidade da molécula hóspede de interagir com complexos vizinhos, além da temperatura, composição e agitação do meio [45].

Considerando a aplicabilidade farmacológica de agregados moleculares de compostos de inclusão em sistemas de liberação de fármacos, pode-se dizer que essa associação é responsável por uma modulação adicional que explicaria o perfil sustentado de liberação das moléculas da cavidade dos macrociclos. Tal fato pode ser explicado pela necessidade do rompimento de forças atrativas que mantém o agregado coeso, e em seguida pela dissociação do sistema hóspede-hospedeiro com a consequente liberação do fármaco que estaria biodisponível para exercer sua ação terapêutica [46]. Dessa forma, o estudo das condições e mecanismos envolvidos na formação dos agregados moleculares de

fármaco/ciclodextrinas deve ser bem compreendido para o desenvolvimento de novos sistemas e compõem objeto de estudo do presente trabalho.

Adicionalmente às propriedades apresentadas, uma tecnologia emergente de aplicação das ciclodextrinas é a sua incorporação estrutural a outros materiais com o objetivo de promover alterações nas propriedades destes e conferir-lhes características supramoleculares [47]. Nesse sentido, as ciclodextrinas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de uma grande variedade de polímeros [48, 49]. Dois tipos distintos de estrutura macromolecular para os polímeros que contém ciclodextrinas têm sido reportados. No primeiro caso a CD modifica a cadeia lateral de outros polímeros atuando como um grupo pendente. No segundo tipo os monômeros de CD compõem a estrutura principal da cadeia polimérica, os quais são conectados por agentes de acoplamento bifuncionais, tais como epícloridrina, diepóxidos, diisocianatos e anidridos [50]. Nesse último caso o polímero é denominado poli-ciclodextrina (poliCD), o qual pode exibir estrutura globular ou linear dependendo das condições empregadas no método de síntese, Figura 1.7 [51, 52]. O agente de acoplamento mais empregado é a epícloridrina. Esse reagente contém dois grupos funcionais ativos: um grupo epóxido e um grupo cloroalquílico que reagem com as hidroxilas das ciclodextrinas. O polímero resultante é constituído por segmentos de tamanhos variados de 2-hidroxiopropil éter ligados às moléculas de CD [53].



**Figura 1.7 - Representação esquemática: (a) poli-ciclodextrina linear e (b) poli-ciclodextrina globular.**

A junção de propriedades poliméricas e supramoleculares exibidas pelas poli-ciclodextrinas torna esse material extremamente versátil, com características desejadas para

serem empregados em sistemas de liberação de fármacos. Por essa razão as poliCDs tem sido alvo de intensa pesquisa em aplicações farmacêuticas e biomédicas [28, 54-58].

### **1.2 Materiais poliméricos e sistemas de liberação de fármacos**

As tecnologias associadas ao desenvolvimento de matrizes utilizadas em sistemas de liberação de fármacos cresceram significativamente nas últimas décadas impulsionadas pelo uso de materiais poliméricos biocompatíveis [59, 60]. A fusão da ciência de polímeros com as ciências farmacêuticas conduziu a um avanço espetacular em termos de inovação nos processos de obtenção, culminado em novas arquiteturas e produtos [61-65].

Uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos é extensamente utilizada como materiais capazes de controlar a liberação do fármaco, sustentando a ação terapêutica ao longo do tempo. Dentre os naturais podem-se citar os polímeros a base de proteínas e os polissacarídeos tais como: colágeno, albumina, agarose, alginato, ácido hialurônico, quitosana e dextran. Diversas classes de polímeros sintéticos também têm sido estudadas, conforme apresentado na Tabela 1.2 [64].

**Tabela 1.2 - Polímeros sintéticos utilizados em sistemas de liberação de fármacos.**

<b>BIODEGRADÁVEIS</b>	
Poliésteres	Poli(ácido lático), poli(ácido glicólico), poli(hidroxiacetato), poli(ε-caprolactona), poli(ácido β-málico), poli(dioxanonas) e copolímeros
Polianidridos	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido terftálico) e copolímeros
Poliamidas	Poli(iminocarbonatos) e poli(aminoácidos)
Polímeros fosforosos	Polifosfatos; polifosfonatos e polifosfazenos
Outros	Poli(cianoacrilatos); poliuretanas; poliortoestéres; polidihidropiranos
<b>NÃO BIODEGRADÁVEIS</b>	
Derivados de celulose	Carboximetil celulose; hidroximetil celulose; etilcelulose; acetato de celulose
Silicones	Poli(dimetilsiloxano)
Polímeros acrílicos	Poli(metacrilatos); poli(metilmetacrilato); polihidroxo(etilmetacrilato)
Outros	Polivinilpirrolidona; etilvinilacetato

Polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles que se degradam para gerar produtos não tóxicos através de mecanismos que envolvem meios enzimáticos, químicos ou microbianos. As vias de degradação descritas podem ocorrer separadamente ou de forma simultânea. Os principais fatores que influenciam a razão de degradação desses materiais são: estrutura química e composição do polímero; distribuição da massa molecular; perfil cristalográfico (amorfo, semicristalino, cristalino); tamanho e forma do dispositivo; local de implantação e mecanismo de hidrólise [64].

Biopolímeros naturais são usualmente biodegradáveis e oferecem excelente biocompatibilidade, porém os lotes produzidos podem sofrer variações devido às dificuldades de purificação. Por outro lado, polímeros sintéticos estão disponíveis em uma extensa variedade de composições com fácil ajuste das propriedades [61]. Os poliésteres são polímeros sintéticos biodegradáveis aprovados para uso em humanos pela Agência de Regulação Norte Americana (*Food and Drug Administration - FDA*) que têm sido extremamente investigados para aplicação em dispositivos de liberação de fármacos demonstrando desempenho e

performance satisfatória [18, 66-69]. Estes polímeros podem ser sintetizados utilizando uma grande variedade de monômeros por reações de abertura de anel de lactonas e anidridos cíclicos, seguidos de reações de policondensação [70]. Dentre eles destacam-se o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros denominados poli(lático-co-glicólico), Figura 1.8. Estes polímeros apresentam boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica e uma cinética previsível de degradação, a qual ocorre por erosão através da clivagem da cadeia polimérica liberando o ácido lático e glicólico [71].

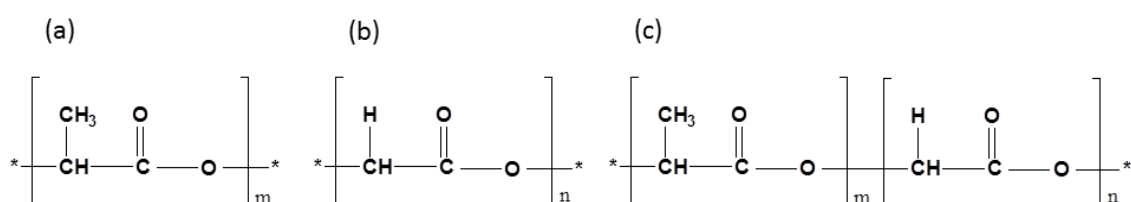


Figura 1.8 - Unidades monoméricas: (a) PLA, (b) PGA e (c) PLGA.

Além dos polímeros biodegradáveis, uma variedade de polímeros não biodegradáveis também é utilizada pela indústria farmacêutica na preparação de sistemas de liberação de fármacos e dentre os quais os polímeros derivados de celulose e os acrílicos, tais como o poli(ácido metacrílico) (PMAA) são extensamente aplicados como revestimentos de formas farmacêuticas, filmes transdérmicos, adesivos bucais e outros dispositivos, Figura 1.9 [72].

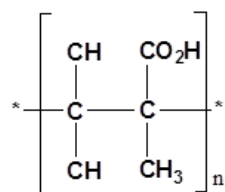


Figura 1.9 - Unidade monomérica do PMAA.

O PMAA é um polímero hidrofílico que possui como importante característica a capacidade de resposta a variações de pH do meio. A formação de ligações cruzadas confere ao PMAA a propriedade de absorver água e inchar. Este comportamento é fortemente influenciado pelo pH devido a ionização dos grupos carboxílicos. Em valores de pH acima de 5,5 os grupos carboxílicos estão ionizados e a repulsão entre as cargas faz com que o PMAA absorva água [73].

A seleção do polímero apropriado para a confecção do dispositivo perpassa pelo conhecimento de suas propriedades físico-químicas, mecânicas e funções biológicas necessárias ao uso pretendido. A preparação de blendas poliméricas é uma opção alternativa para a preparação de novos materiais, uma vez que o sistema obtido pode combinar propriedades associadas aos materiais de partida, resultando em maior modulação de liberação do fármaco [74][75].

O uso da nanotecnologia em aplicações médicas tem revolucionado o desenvolvimento de vários tipos de carreadores de fármacos a base de polímeros, tais como nanopartículas, hidrogéis, micelas, lipossomas e nanofibras [10, 18, 76-80].

### 1.3 Eletrofiação

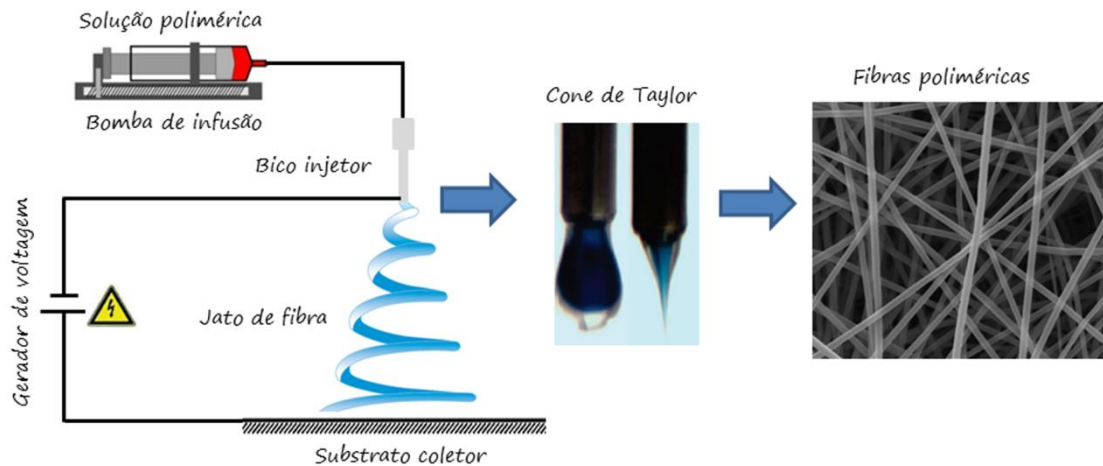
Fibras poliméricas são convencionalmente preparadas empregando-se processos mecânicos tais como a extrusão, através dos quais são obtidos diâmetros da ordem de dezenas de micrometros, similares às fibras naturais. Nas últimas décadas, avanços em novas tecnologias de obtenção de fibras poliméricas tem impulsionado um maior controle da morfologia, bem como a redução significativa de seu diâmetro [81].

A técnica denominada eletrofiação (do inglês *electrospinning*) tem recebido grande destaque na preparação de fibras poliméricas contínuas utilizando soluções poliméricas ou polímeros fundidos através da aplicação de um campo elétrico. Tal processo é eficiente e versátil na obtenção de diferentes fibras poliméricas multifuncionais com morfologias e arquiteturas em duas (2D) e três dimensões (3D), cujos diâmetros variam da ordem de 10 a 10.000 nanômetros [82].

A primeira descrição de obtenção de fibras poliméricas empregando-se um campo elétrico foi realizada por Anton Formhals na forma de uma patente em 1934, contudo, tal procedimento permaneceu sem utilização comercial durante este período. A técnica de eletrofiação recebeu esta denominação e substancial atenção a partir de 1990 com os trabalhos de Reneker e colaboradores, os quais estudaram a formação de fibras finas utilizando diversos polímeros [83]. Desde então, o número de publicações científicas e patentes depositadas cresceram exponencialmente em decorrência da simplicidade e potencialidade da técnica.

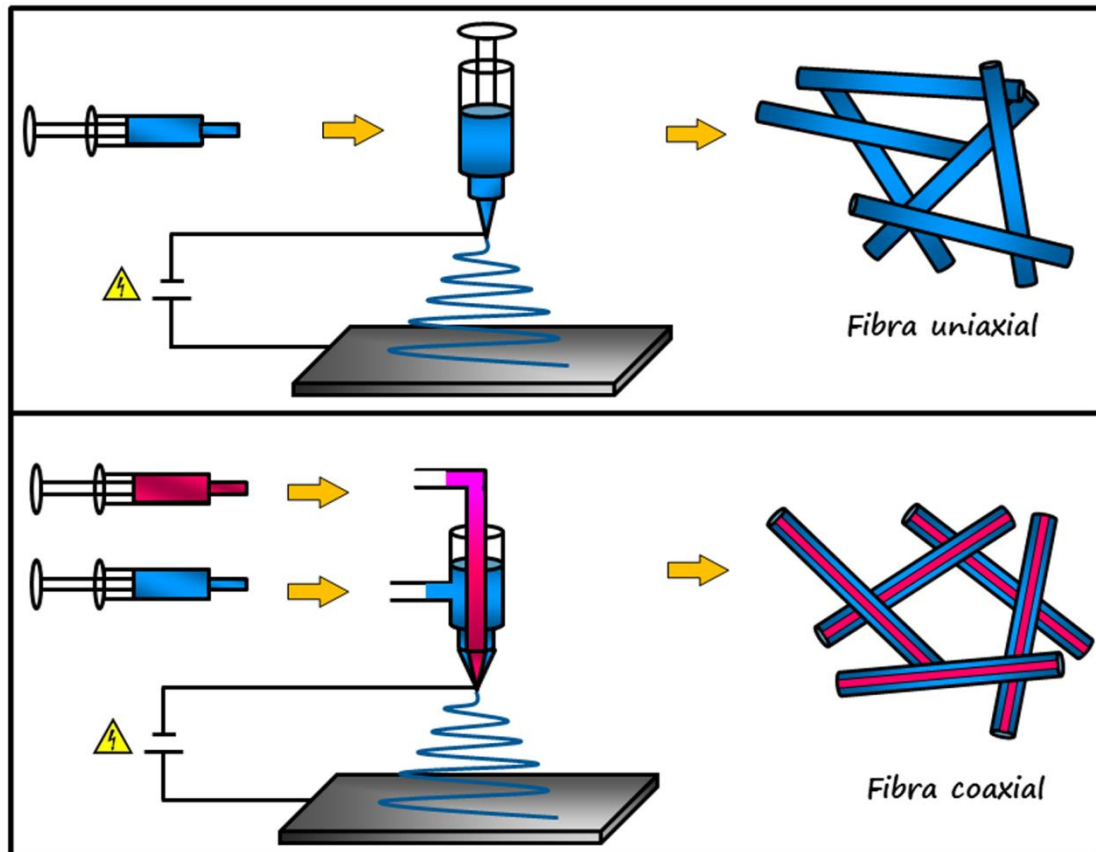
A Figura 1.10 apresenta um equipamento em escala laboratorial de eletrofiação, o qual é composto pelos seguintes componentes básicos: gerador de voltagem, bomba de infusão, bico injetor e substrato coletor [82]. Uma seringa que armazena o polímero fundido ou sua solução é conectada ao bico injetor e com o auxílio da bomba de infusão este líquido é bombeado a uma razão de fluxo controlada. Quando a alta voltagem é aplicada ao sistema, a

gota pendente de líquido se distorce devido às repulsões eletrostáticas entre as cargas de superfície formando o denominado cone de Taylor. No momento em que a força repulsiva supera a tensão superficial do líquido, um jato de fibras é ejetado e depositado no substrato coletor [84].



**Figura 1.10 - Representação esquemática do equipamento de eletrofiação, cone de Taylor e fibras de PMAA obtidas por eletrofiação.**

Com o objetivo de obter diferentes morfologias e arquiteturas, o equipamento básico de eletrofiação pode ser alterado, principalmente no que se refere ao bico injetor e ao substrato coletor [85]. Os bicos injetores são geralmente constituídos por materiais metálicos e podem ser formados por saídas únicas ou múltiplas. Os bicos de saídas únicas dão origem às fibras denominadas uniaxiais, cuja estrutura é formada por uma estrutura maciça de polímero. Os bicos de saídas múltiplas são alinhados concêntricamente e dão origem às fibras coaxiais, cuja estrutura consiste de uma fibra interna recoberta por outra externa, Figura 1.11. Além disso, estes bicos injetores múltiplos podem formar também fibras ocas [85]. O uso de vários bicos injetores alinhados em paralelo além de permitir o aumento da eficiência de produção, possibilita a obtenção de sistemas compósitos formados por diferentes fibras poliméricas [82].



**Figura 1.11 - Representação esquemática da preparação de fibras uniaxiais utilizando bico injetor de saída única e fibras coaxiais utilizando bicos injetores de saídas múltiplas.**

Fibras são geralmente coletadas na forma de membranas em duas dimensões (2D), utilizando substratos coletores estáticos e planares. Para aumentar de forma significativa as potencialidades e o desempenho das fibras poliméricas estas podem ser produzidas em arranjos tridimensionais utilizando substratos coletores em 3D para a deposição. Os substratos coletores podem ser tubos múltiplos interconectados com diferentes tamanhos, formas e padrões [86].

Parâmetros instrumentais e associados à solução polimérica devem ser controlados para otimizar e viabilizar a obtenção reprodutível das fibras, uma vez que influenciam no diâmetro, morfologia e características superficiais. Dentre eles destacam-se os parâmetros da solução polimérica: concentração, viscosidade, massa molecular do polímero, condutividade e volatilidade do solvente; bem como os parâmetros instrumentais: razão de fluxo, força do campo elétrico, distância do bico injetor ao substrato coletor. Além desses, a temperatura e umidade do ambiente desempenham um importante papel nas características das fibras [87].

Geralmente, baixas concentrações de polímero levam à interrupção do jato de fibras ocasionando a formação de gotas por toda sua extensão. Por outro lado, altas concentrações

de polímero podem aumentar o diâmetro da fibra ou prevenir o jato de ejeção devido ao aumento da tensão superficial. O efeito da viscosidade ocorre da mesma forma que o da concentração, ou seja, baixas viscosidades estão associadas à interrupção da formação de fibras, ao passo que, altas viscosidades não são recomendadas para a obtenção destes sistemas. A massa molecular do polímero afeta a viscosidade, tensão superficial e condutividade da solução. Estudos mostram que a formação de fibras está associada a polímeros que possuam altos pesos moleculares. Incrementos na condutividade da solução polimérica levam a formação de fibras mais homogêneas, mesmo a baixas concentrações de polímero. O aumento da condutividade pode ser obtido por incorporação de sais inorgânicos como NaCl, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> [82, 87].

Com relação aos parâmetros instrumentais, o aumento do fluxo de injeção da solução polimérica ocasiona o aumento do diâmetro da fibra e a baixa razão de fluxo impede a formação do jato. O efeito do campo elétrico é oposto ao do fluxo de injeção, altos campos elétricos geram mais cargas superficiais na solução polimérica diminuindo seu diâmetro. Por essa razão deve haver um controle simultâneo destes dois parâmetros para obtenção de fibras com características desejadas. Além disso, é necessária uma distância mínima do bico injetor ao coletor para que haja tempo suficiente para a fibra secar antes de se depositar. Tal distância irá depender da concentração da solução e da voltagem aplicada, mas em geral, está entre 10 a 25 cm [82, 87]. A Figura 1.12 ilustra como a concentração da solução polimérica, razão de fluxo e campo elétrico influenciam a formação de fibras.

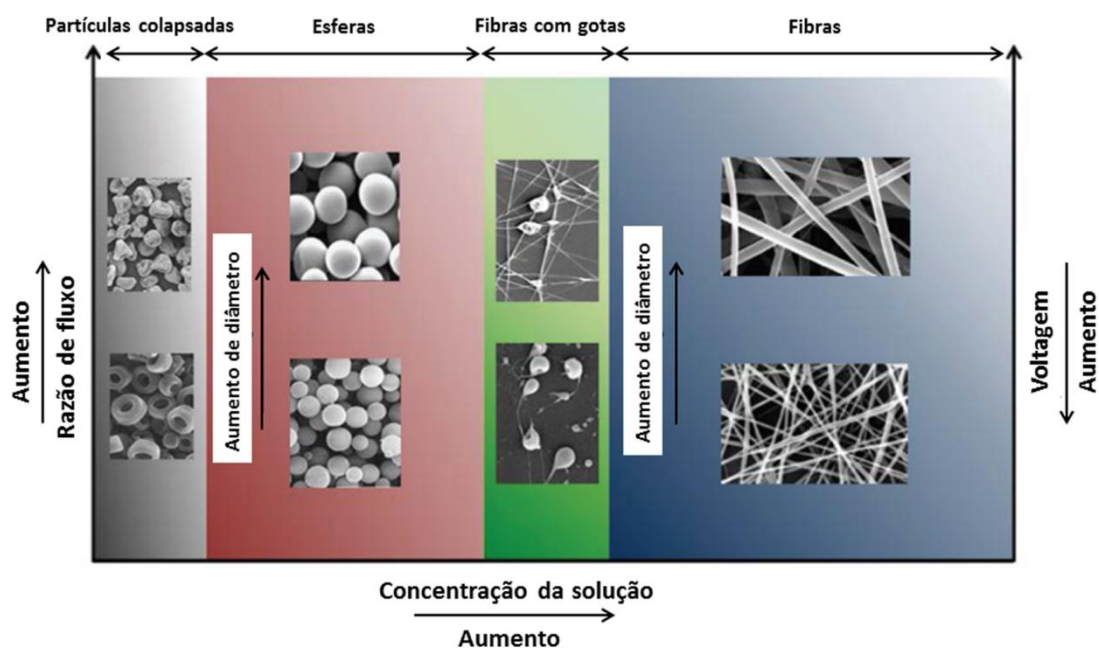


Figura 1.12 - Ilustração esquemática do efeito da concentração solução polimérica, razão de fluxo e campo elétrico na obtenção de fibras poliméricas por eletrospinning [88].

Fibras poliméricas têm atraído grande interesse em várias áreas do conhecimento incluindo a têxtil, ambiental, catálise, membranas e filtros [89], sensores, energia, engenharia de tecidos e liberação de fármacos devido a suas características multifuncionais tais como grande razão área/volume, possibilidade de modificação de superfície/funcionalização e incorporação de diversos materiais [90]. Como sistemas de liberação de fármacos, as fibras poliméricas podem oferecer terapias de administração sistêmica e local quando comparadas a outros dispositivos como as nanopartículas, nanocápsulas e micelas que devido a sua fluidez intrínseca possuem maior dificuldade de se fixar em áreas do corpo. Além disso, as fibras são capazes de melhorar significativamente as taxas de encapsulamento de fármacos e podem ser cortadas em qualquer tamanho e forma, tornando-as atrativas para aplicações clínicas [88, 91].

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo geral**

Diante do exposto o presente trabalho tem por objetivo central o desenvolvimento destes sistemas supramoleculares baseados em ciclodextrinas e nanofibras de polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de fármacos utilizando como modelo um fármaco anti-hipertensivo (cloridrato de propranolol) e um quimioterápico (cloridrato de daunorubicina).

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Preparar compostos de inclusão formados por  $\beta$ -ciclodextrina e cloridrato de propranolol. Estudar os sistemas supramoleculares formados utilizando diferentes técnicas de caracterização em solução;
- Investigar o processo de auto-associação dos compostos de inclusão, determinando os parâmetros termodinâmicos de interação, bem como o tamanho e massa molecular dos agregados formados;
- Sintetizar e caracterizar polímeros supramoleculares a base de  $\beta$ -ciclodextrina (poli $\beta$ CD);
- Realizar ensaios de citotoxicidade em fibroblastos para os polímeros sintetizados;
- Preparar fibras poliméricas a base dos polímeros supramoleculares sintetizados e polímeros comerciais biocompatíveis em associação com cloridrato de propranolol e cloridrato de daunorubicina;

- Investigar o perfil cinético de liberação dos fármacos *in vitro* a partir das fibras sintetizadas.
- Avaliar *in vitro* e *in vivo* a citotoxicidade, efeitos inflamatórios e anti-angiogênicos para as fibras contendo cloridrato de daunorubicina.

# ***CAPÍTULO 2***

## ***Materiais e Métodos***

---

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento do presente trabalho possuem grau analítico. Abaixo estão descritas algumas propriedades físico-químicas e a procedência da  $\beta$ -ciclodextrina, dos fármacos cloridrato de propranolol e cloridrato de daunorubicina, polímeros comerciais poli(ácido metacrílico) e poli(lático-co-glicólico) (50:50).

#### *$\beta$ -ciclodextrina*

Código:  $\beta$ CD

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hepta-glucoamilose

Fórmula molecular:  $C_{42}H_{70}O_{35} \cdot 11H_2O$

Massa molar:  $1135 \text{ g mol}^{-1}$

pKa: 12,1 [92]

Ponto de fusão:  $311,31 \text{ }^\circ\text{C}$  [93]

Fabricante: Xiamem Mchem Pharma LTD.

Lote: 20031210

#### *Cloridrato de propranolol*

Nomenclatura IUPAC: cloridrato de 1-[(1-metiletil)amino]-3-(1-naftaleniloxi)-2-propanol

Fórmula molecular:  $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$

Massa molar:  $295,80 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade: solúvel em água e etanol, pouco solúvel em clorofórmio e éter etílico

pKa: 9,5 [94]

Pureza: 99,2%

Ponto de fusão:  $163 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $166 \text{ }^\circ\text{C}$

Fabricante: Changzhou Yabang Pharmaceutical Co., Ltd

Lote: M090810

#### *Cloridrato de daunorubicina*

Nomenclatura IUPAC: cloridrato de (8S,10S)-8-acetil-10-[(2S,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metil-oxan-2-il]oxi-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-9,10-dihidro-7H-tetraceno-5,12-diona

Fórmula molecular:  $C_{27}H_{29}NO_{10} \cdot HCl$

Massa molar:  $527,52 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade: solúvel em água, dimetilformamida

pKa: 10,3

Ponto de fusão: 208 °C a 209 °C

Fabricante: Tecoland Corporation

Lote: 20130708

*Poli(ácido metacrílico)*

Massa molar: 100.000 g mol<sup>-1</sup>

Solubilidade: solúvel em água, metanol, soluções alcalinas

Fabricante: Polyscience, Inc.

Lote: 623077

*Poli(lático-co-glicólico) (50:50)*

Massa molar: 60.000 g mol<sup>-1</sup>

Solubilidade: diclorometano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetona

Fabricante: Polyscience, Inc.

Lote: D011093

*Demais reagentes utilizados*

1. Água tipo 1: Milli-Q® - Millipore
2. Óxido de deutério (D<sub>2</sub>O): Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 99,9 % de pureza
3. Epicloridrina: Sigma-Aldrich
4. Hidróxido de sódio: Vetec
5. Ácido clorídrico: Vetec
5. *N,N*-dimetilformamida: Sigma-Aldrich
6. Tetrahidrofurano: Vetec
7. Dodecilsulfato de sódio: LGC Biotecnologia
8. Acetona: Vetec
9. Ácido fórmico grau HPLC: Merck
10. Hidrogeno fosfato dissódico: Vetec
11. Dihidrogeno fosfato de potássio: Vetec
12. Brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-(difeniltetrazol): Sigma-Aldrich
13. Meio de cultura *DMEM high glucose*: Invitrogen
14. Meio de cultura *DMEM low glucose*: Invitrogen

## **2.2 Descrição dos experimentos**

### **2.2.1 Preparo do composto de inclusão**

O composto de inclusão de cloridrato de propranolol e  $\beta$ -ciclodextrina (PROP: $\beta$ CD) foi preparado em proporções equimolares empregando-se o método de liofilização já relatado na literatura [47, 95, 96]. Dessa forma, foram dissolvidos 192 mg (0,17mmol) de  $\beta$ CD em 50 mL de água. Em seguida, foram adicionados 50 mg (0,17 mmol) de cloridrato de propranolol à solução de  $\beta$ CD. A mistura permaneceu sob agitação por 4 horas, a temperatura ambiente, e foi submetida ao processo de congelamento, empregando-se nitrogênio líquido para posterior secagem a pressão reduzida (liofilização).

### **2.2.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos de interação do sistema PROP: $\beta$ CD**

Com o intuito de obter os parâmetros físico-químicos de interação molecular para o sistema formado por cloridrato de propranolol e  $\beta$ CD foram obtidas as curvas de calorimetria de titulação isotérmica (titulações realizadas em triplicata), nas quais foram adicionados 49 incrementos sucessivos de 5  $\mu$ L de uma solução aquosa do fármaco (80 mmol L<sup>-1</sup>) em 1,0 mL de solução aquosa de  $\beta$ CD (1 mmol L<sup>-1</sup>) presente na cela calorimétrica de reação. A razão molar de PROP/ $\beta$ CD variou de 0,09 a 22,62. Intervalos de 600 segundos foram utilizados entre cada injeção para que o sinal analítico retornasse a linha de base. A solução presente na cela calorimétrica permaneceu sob agitação de 250 rpm durante todos os experimentos. Para avaliar a influência da temperatura nos parâmetros termodinâmicos, as titulações foram realizadas em cinco temperaturas: 278,15; 288,15; 298,15; 308,15 e 318,15 K. Foram obtidas também as curvas de titulação da solução de cloridrato de propranolol em água, bem como as curvas de titulação da solução de  $\beta$ CD em água e ambas foram subtraídas das curvas de titulação de fármaco em  $\beta$ CD para eliminar efeitos de diluição dos dois compostos em água.

### **2.2.3 Avaliação do tamanho dos agregados moleculares do sistema PROP: $\beta$ CD**

Com o objetivo de obter informações associadas ao tamanho dos agregados moleculares que poderiam se formar mediante a interação de cloridrato de propranolol e  $\beta$ CD em água, foram realizadas titulações monitoradas por espalhamento de luz dinâmico (triplicata) a 25 °C, nas quais 49 incrementos sucessivos de 10  $\mu$ L de solução aquosa do fármaco (80 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados em 2,0 mL de solução aquosa de  $\beta$ CD (1 mmol L<sup>-1</sup>), e após cada adição, foi obtida a média da intensidade da luz espalhada na solução final (média de 10 medidas). A variação da razão molar de PROP/ $\beta$ CD foi a mesma utilizada nos

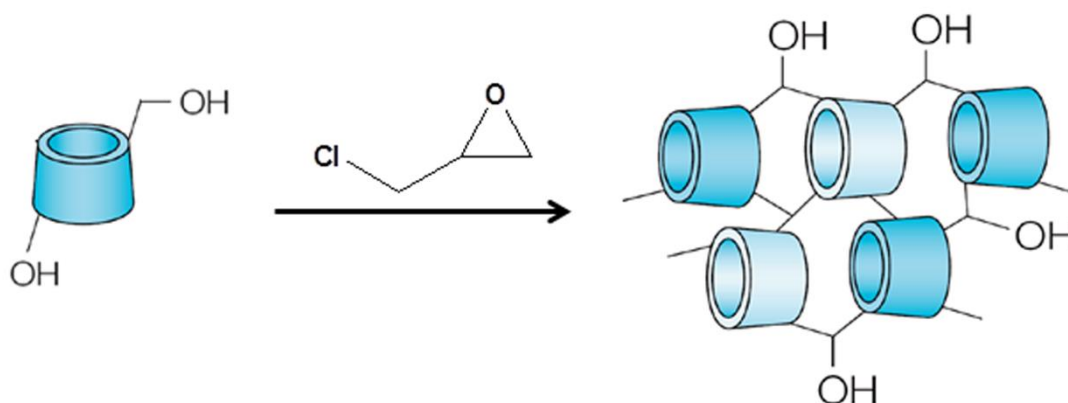
experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, ou seja, variou de 0,09 a 22,62. Assim, para cada ponto da titulação obteve-se a medida da distribuição do tamanho dos agregados formados. Para efeito comparativo também foram realizadas titulações em branco do cloridrato de propranolol em água, bem como  $\beta$ CD em água. Tais titulações foram realizadas em triplicata e nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

#### **2.2.4 Avaliação da massa molecular dos agregados moleculares do sistema PROP: $\beta$ CD**

Com o objetivo de verificar a formação e a massa de possíveis agregados moleculares do sistema formado por cloridrato de propranolol e  $\beta$ -ciclodextrina na proporção 1:1, bem como para os compostos livres foram realizadas medidas por espectrometria de massas. As amostras foram solubilizadas em solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e injetadas diretamente na fonte do espectrômetro de massas nas seguintes concentrações: 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o composto de inclusão e  $\beta$ CD; e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o cloridrato de propranolol. A voltagem do capilar e do cone foram respectivamente 3200 e 30 V, com temperatura de dessolvatação de 120°C e varredura de 100 a 2000  $m/z$ .

#### **2.2.5 Síntese de polímeros a base de $\beta$ -ciclodextrina**

Polímeros sintetizados a base de  $\beta$ -ciclodextrina (poli $\beta$ CD) foram obtidos através de pequenas modificações em métodos previamente descritos na literatura [50, 51]. Foram empregadas reações de policondensação utilizando  $\beta$ -ciclodextrina e epicloridrina, a qual atua como agente de acoplamento bifuncional e promove a interconexão dos monômeros de  $\beta$ CD. A síntese se processa em meio fortemente alcalino, uma vez que o valor de  $pK_a$  da  $\beta$ CD é de 12,1 [92]. Tal reação resulta na formação de polímeros nos quais a ciclodextrina compõe a estrutura principal da cadeia polimérica, conforme apresentado na Figura 2.1.



**Figura 2.1 - Reação entre ciclodextrina e epicloridrina para formação de estrutura macromolecular, na qual a ciclodextrina compõem a estrutura principal da cadeia polimérica.**

Para tanto 10 g (8,8 mmol) de  $\beta$ CD foram solubilizadas em 15 mL de solução de hidróxido de sódio 15 % (p/V), e mantida sob agitação mecânica por duas horas. A solução foi aquecida a 35 °C e foram adicionados 7 mL (88 mmol) de epicloridrina (EP), mantendo-se a razão molar EP/ $\beta$ CD igual a 10. A temperatura e agitação mecânica foram mantidas constantes durante toda a reação que se processou por quatro horas e foi interrompida pela adição de 50 mL de acetona. Após decantação, a acetona foi removida e o pH da fase aquosa foi neutralizado utilizando-se solução de ácido clorídrico 6 mol L<sup>-1</sup>. Visando purificar o polímero sintetizado, a solução resultante foi dialisada em água durante sete dias utilizando membrana MWCO 7 KDa. Posteriormente, a solução polimérica foi submetida a aquecimento em estufa a vácuo a uma temperatura de 60 °C até a obtenção do polímero seco. O polímero foi submetido à caracterização físico-química e foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico.

### **2.2.6 Determinação da massa molar ponderal média, raio de giro e segundo coeficiente do virial para poli $\beta$ CD sintetizada**

A técnica de espalhamento de luz estático foi utilizada como um método direto para determinação da massa molar ponderal média ( $M_w$ ) da poli $\beta$ CD sintetizada, bem como do raio de giro ( $R_g$ ) e do segundo coeficiente do virial ( $A_2$ ). As medidas foram realizadas em um equipamento de espalhamento de luz a ângulos múltiplos em colaboração com o prof. Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Foi utilizado o método de Zimm para a obtenção dos parâmetros citados, no qual é medida a intensidade da luz espalhada por diferentes concentrações da solução polimérica a diferentes ângulos. Para

tanto, foram preparadas soluções de poliβCD com concentrações variando de 0,4 a 5 g mL<sup>-1</sup>, as quais foram filtradas em membranas de 0,45 μm para posterior realização das medidas. A leitura da intensidade da luz espalhada foi determinada em uma faixa angular de 30 - 110° utilizando um passo de 10°. A água Milli-Q® foi utilizada como padrão para a determinação da razão de Rayleigh e para o cálculo da constante óptica *K*. O incremento do índice de refração em função da concentração, necessário para determinação de *M<sub>w</sub>* foi obtido em refratômetro diferencial, o qual é capaz de medir a diferença de índice de refração entre uma solução como uma função da concentração de soluto. Para este experimento as concentrações de solução polimérica variaram de 1 a 10 mg mL<sup>-1</sup>.

### **2.2.7 Determinação da citotoxicidade da poliβCD sintetizada**

Com o intuito de avaliar *in vitro* o potencial citotóxico dos polímeros sintetizados, foram realizados ensaios de viabilidade celular pelo método de metabolização do MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-(difeniltetrazol) em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Maria Esperanza Cortés da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Para o cultivo de fibroblastos gengivais humanos foi utilizado o meio de cultura *DMEM high glucose* suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular *Zellkultur flaschen* de 75 mL em estufa com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> (12 %) a 37 °C até o ponto de confluência. Posteriormente, as células foram tratadas com solução de tripsina/EDTA e semeadas em placas de cultura celular de 96 poços com densidade inicial de 9 x 10<sup>5</sup> células/poço. As placas foram incubadas por 72 horas para permitir adesão das células nos poços.

Após esse período, soluções dos polímeros recentemente preparadas em meio *DMEM high glucose* foram adicionadas nas concentrações de 10000 a 1,56 μg mL<sup>-1</sup> (sextuplicata) e incubadas por 48 horas. Em seguida, cada poço foi lavado com meio *DMEM low glucose* e aplicados 10 μl/poço da solução de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de MTT diluído em solução aquosa de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e as culturas celulares foram incubadas por mais 4 horas nas mesmas condições. Ao término do período de exposição ao MTT, os meios foram aspirados e as monocamadas celulares dissolvidas com 100μL/poço de dodecilsulfato de sódio (solução 10 % p/V em HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>). A solução azul de formazan obtida foi submetida à leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Assim, a intensidade da coloração azul, é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A absorvância foi então utilizada para o cálculo das porcentagens de viabilidade celular. A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA utilizando um valor de significância *P* < 0,05.

### **2.2.8 Preparação de fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais de cloridrato de propranolol em matriz de PMAA e poliβCD**

Fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais a base de poliβCD e poli(ácido metacrílico) (PMAA) na presença e ausência de cloridrato de propranolol foram preparadas pelo método de eletrofiação utilizando gerador de voltagem Gamma High Voltage Research ES40 e bomba de injeção Harvard Apparatus PHD 2000. A distância entre o bico injetor e a placa coletora foi de aproximadamente 25 cm.

Para obter as fibras uniaxiais foram preparadas blends poliméricas utilizando *N,N*-dimetilformamida como solvente, a concentração total de polímeros foi de 250 mg mL<sup>-1</sup> e as proporções foram de 100:0; 80:20 e 60:40 % (p/p) de PMAA:poliβCD. Os mesmos sistemas também foram preparados com adição de cloridrato de propranolol na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>. As soluções poliméricas permaneceram sob agitação por 24 horas para que os polímeros fossem solubilizados e para que o fármaco interagisse com as cavidades das βCD. Para obter esta configuração de fibra foi utilizado um bico injetor de saída única e as condições experimentais empregadas foram de fluxo de 3,0 - 2,5 mL h<sup>-1</sup> e voltagem de 15 kV. Posteriormente, as fibras foram submetidas a um tratamento térmico e, assim, foram aquecidas a 170° C por 48 horas com o objetivo de promover o processo de ligação cruzada entre as cadeias poliméricas.

Fibras coaxiais também foram preparadas utilizando os polímeros já descritos nas mesmas concentrações. Nessa configuração as soluções poliméricas individualizadas foram bombeadas até um bico injetor de saída múltipla, no qual um capilar menor passa por dentro de um capilar maior e as duas soluções se combinam somente na saída do bico injetor, conforme já relatado por Yu e colaboradores (2010) [97]. A solução que compõe o interior da fibra é a de poliβCD e cloridrato de propranolol na qual foi utilizado um fluxo de 1,0 mL h<sup>-1</sup> e a solução de revestimento externo é a de PMAA na qual foi utilizado um fluxo de 2,0 mL h<sup>-1</sup>. A voltagem aplicada em todo o sistema foi de 15 kV. Estas fibras também foram submetidas ao mesmo tratamento térmico descrito anteriormente. Todo o conteúdo de cloridrato de propranolol foi considerado incorporado às fibras, uma vez que o fármaco foi totalmente solubilizado na solução polimérica resultante e todo o volume desta foi convertido em fibras.

### **2.2.9 Estudo da cinética de liberação *in vitro* para as fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais de cloridrato de propranolol em matriz de PMAA e poli $\beta$ CD**

Os estudos de cinética de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol a partir de fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais a base de PMAA e poli $\beta$ CD obtidas após tratamento térmico foram efetuados em uma incubadora de bancada Contemp modelo Q120A3, a 37 °C e 100 rpm. As amostras foram pesadas em triplicata (cerca de 100 mg) e acondicionadas em tubos Falcon contendo 3 mL de tampão fosfato pH = 7,4. Alíquotas de 3,0 mL foram coletadas a cada 15 minutos na primeira hora; a cada hora nas primeiras 8 horas e em seguida a cada 24 horas até o final do experimento. Após cada coleta foi realizada a reposição do meio com adição de mais 3,0 mL de tampão fosfato. O fármaco cloridrato de propranolol foi quantificado em cada alíquota por Espectroscopia de Absorção na Região de Ultravioleta-Visível a 290 nm. As soluções-padrão utilizadas para construir a curva de calibração foram preparadas através da diluição sucessiva de uma solução estoque de cloridrato de propranolol em tampão fosfato pH 7,4 abrangendo uma faixa de trabalho de 5,0 a 66,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , cujo coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi maior que 0,99.

### **2.2.10 Preparação de fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA**

Fibras poliméricas uniaxiais a base de PLGA na presença e ausência de cloridrato de daunorubicina foram preparadas pelo método de eletrospinação utilizando gerador de voltagem Gamma High Voltage Research ES40 e bomba de injeção Harvard Apparatus PHD 2000. A distância entre o bico injetor e a placa coletora foi de aproximadamente 25 cm.

Para obter as fibras preparou-se uma solução de PLGA (50:50) na concentração de 25 % m/v utilizando-se a mistura de solventes formada por *N,N*-dimetilformamida e tetrahidrofurano na proporção de 70:30 v/v. Os mesmos sistemas também foram preparados com adição de daunorubicina na concentração de 7 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Para obter esta configuração de fibra foi utilizado um bico injetor de saída única e as condições experimentais empregadas foram de fluxo de 1,0 mL  $\text{h}^{-1}$  e voltagem de 18 - 20 kV. Após o processo de eletrospinação, as fibras foram coletadas, armazenadas em dessecador ao abrigo da luz e, posteriormente, foram aquecidas a 35 °C sob vácuo por 48 horas para a eliminação de resíduos de solvente.

### **2.2.11 Estudo da cinética de liberação *in vitro* para fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA**

Os estudos de cinética de liberação *in vitro* de cloridrato de daunorubicina a partir de fibras poliméricas uniaxiais a base de PLGA foram efetuados em uma incubadora de bancada Contemp modelo Q120A3, a 37 °C e 50 rpm. As amostras foram pesadas em triplicata (cerca de 20 mg) e acondicionadas em tubos Falcon contendo 1 mL de tampão fosfato pH = 7,4. Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas a cada 15 minutos na primeira hora; a cada hora nas primeiras 8 horas e em seguida a cada 24 horas até o final do experimento. Após cada coleta foi realizada a reposição do meio com adição de mais 1,0 mL de tampão fosfato. O fármaco cloridrato de daunorubicina foi quantificado em cada alíquota por Espectroscopia de Absorção na Região de Ultravioleta-Visível a 475 nm. As soluções-padrão utilizadas para construir a curva de calibração foram preparadas através da diluição sucessiva de uma solução estoque de cloridrato de daunorubicina em tampão fosfato pH 7,4 abrangendo uma faixa de trabalho de 7,3 a 54,6 µg mL<sup>-1</sup>, cujo coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) foi maior que 0,99.

### **2.2.12 Determinação da viabilidade celular das fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA**

Com o intuito de avaliar *in vitro* o potencial citotóxico das fibras de PLGA contendo daunorubicina incorporada, foram realizados ensaios de viabilidade celular pelo método de metabolização do MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-(difeniltetrazol) em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Maria Esperanza Cortés da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Para o cultivo das células tumorais A431 foi utilizado o meio de cultura *DMEM* suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mmol L<sup>-1</sup>), penicilina e streptomomicina (100 UI mL<sup>-1</sup>) e N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (25 mmol L<sup>-1</sup>). As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular *Zellkultur flaschen* de 75 mL em estufa com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37 °C. O meio foi trocado de 2 a 3 vezes por semana e as células foram tratadas com solução de tripsina/EDTA. Os fibroblastos gengivais humanos foram cultivados em meio de cultura *DMEM* suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino, penicilina e streptomomicina (100 UI mL<sup>-1</sup>) e mantidas em estufa com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37 °C. Ambas as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade inicial de 4 x 10<sup>3</sup> células/poço e incubadas por 24 horas para permitir sua adesão nos poços.

Posteriormente, as células foram incubadas com a daunorubicina livre (DNR), fibras de PLGA e fibras de PLGA contendo daunorubicina (PLGA-DNR) por 48 horas. As concentrações

de DNR nas formulações foram de 0,1; 0,05; 0,025 e 0,0125  $\mu\text{ mol L}^{-1}$ . Cada concentração de DNR foi testada em *semplicata*. Após as 48 horas de incubação a viabilidade celular foi avaliada conforme descrito no item 2.2.7. A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA utilizando um valor de significância  $P < 0,05$ .

### **2.2.13 Avaliação dos efeitos inflamatórios e anti-angiogênicos de fibras poliméricas de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA**

Estudos *in vivo* para avaliar os efeitos inflamatórios e anti-angiogênicos das fibras poliméricas de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA foram realizados em colaboração com a prof<sup>a</sup> Silvia P. Andrade do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Tais ensaios estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) tendo como número de protocolo 267/2014.

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 7 a 8 semanas de idade e peso corporal entre 25 a 30 gramas fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Discos de esponja esterilizados de poliéster-poliuretano proveniente da Vitafoam Ltd. com dimensões de 4 mm de espessura e 12 mm de diâmetro foram utilizados para suportar os implantes de fibras de PLGA, PLGA contendo daunorubicina (PLGA-DNR) e daunorubicina livre. A concentração de fármaco foi de 1,1  $\text{mg kg}^{-1}$  para todos os grupos avaliados e o disco de esponja foi utilizado com grupo controle.

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (1  $\text{mg kg}^{-1}$ ). As fibras foram inseridas de forma adjacente às esponjas em uma bolsa subcutânea obtida por dissecação na região dorsal. Os animais foram monitorados no pós-operatório para detectar quaisquer sinais de infecção, desconforto ou sofrimento. Após 7 dias, os animais foram eutanasiados e as esponjas retiradas para análise para avaliar os níveis de hemoglobina (Hb), mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF). O experimento foi realizado com 8 animais por grupo.

A extensão da vascularização foi determinada pela concentração de hemoglobina através de método de Drabkin. Neste método o Fe (II) presente na molécula de Hb é oxidado a Fe(III) pelo ferricianeto de potássio, dando origem a hemiglobina, a qual reage com o cianeto de potássio formando cianeto de hemiglobina, cuja detecção é realizada por espectroscopia na região do visível. Para tanto, os implantes foram pesados e homogeneizados em 2 mL de reagente de Drabkin (Kit de dosagem hemoglobina-Labtest). As amostras foram centrifugadas

por 40 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ . A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura a 540 nm.

O sedimento obtido na determinação da concentração de hemoglobina foi pesado e parte foi utilizado na determinação dos níveis de MPO. Para tanto, foi adicionado a este sedimento 2 mL de tampão salino EDTA-fosfato de sódio pH 4,7, seguido de homogeneização e centrifugação a 12000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento 2 mL de tampão fosfato de sódio pH 5,4 contendo 0,5 % (m/v) de brometo de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio, surfactante importante na extração da MPO. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e foi adicionado ao sobrenadante 100  $\mu\text{L}$  de solução de tetrametilbenzina 1,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3  $\text{mmol L}^{-1}$ . Após 1 minuto, a reação é interrompida com a adição de solução de ácido sulfúrico 4  $\text{mol L}^{-1}$ , com posterior leitura a 450 nm, a qual é proporcional a concentração de MPO na amostra. De um modo geral, a MPO liga-se ao peróxido de hidrogênio e o complexo resultante é capaz de oxidar o substrato de tetrametilbenzina.

A atividade da NAG foi determinada pela reação de hidrólise que esta enzima é capaz de realizar no composto p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina (substrato) liberando p-nitrofenol. Este ensaio foi realizado em parte do sedimento obtido na análise de hemoglobina. Os sedimentos foram pesados e a estes foi adicionada solução de NaCl 0,9 % (m/v) contendo 0,1 % (v/v) de Triton X-100. Após homogeneização e centrifugação a 3000 rpm, o sobrenadante foi utilizado para realização do ensaio. Para tanto, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina em tampão citrato/fosfato de sódio pH 4,5 na concentração de 2,24  $\text{mmol L}^{-1}$ . Após incubação a 37 °C por 10 minutos, foi adicionado ao sistema 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  pH 10,6 para interromper a reação. A quantidade produzida de p-nitrofenol é determinada por leitura a 405 nm e é proporcional a atividade enzimática da NAG na amostra.

O sedimento obtido na determinação da concentração de hemoglobina foi pesado e parte foi utilizada na determinação dos níveis de VEGF. Para tanto, foi adicionado a este 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,05 % m/v de Tween, seguido de homogeneização e centrifugação a 10000 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foram utilizados em kits de imunensaio (R&D Systems, EUA).

### 2.3 Descrição das técnicas de caracterização

#### 2.3.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz) pertencente ao DQ-UFMG. O solvente utilizado foi D<sub>2</sub>O com pureza isotópica de 99,9 %. As amostras foram preparadas em tubos de RMN de 8,00 polegadas de comprimento e 5 mm de diâmetro externo.

Com o intuito de obter a caracterização estrutural do cloridrato de propranolol foram realizados experimentos uni- e bidimensionais. Os experimentos unidimensionais de hidrogênio (<sup>1</sup>H) com supressão do sinal de água, carbono (<sup>13</sup>C) e de *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*, (DEPT) foram realizados em sonda dual <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C de detecção direta. Para a determinação inequívoca dos sinais, também foram realizados experimentos bidimensionais de <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H *Homonuclear Correlation Spectroscopy* (COSY), <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) e <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (HMBC).

Para caracterizar o composto de inclusão formado por cloridrato de propranolol e β-ciclodextrina (PROP:βCD) foram realizados experimentos uni- e bidimensionais. Assim, foram obtidos os espectros de <sup>1</sup>H para a ciclodextrina e para o cloridrato de propranolol em presença de βCD. Com o intuito de demonstrar a possível interação hóspede-hospedeiro, foi realizado o experimento bidimensional de <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H *Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy* (ROESY) em sonda de 5 mm multinuclear de detecção inversa. Essa análise foi conduzida a 27 °C e o tempo de mistura foi equivalente a 600 milissegundos.

Experimentos de RMN também foram utilizados para caracterizar os polímeros sintetizados a base de β-ciclodextrina (poliβCD), utilizando experimentos de <sup>1</sup>H. A proporção de βCD incorporada na cadeia polimérica foi determinada através da intensidade relativa dos sinais dos átomos de hidrogênios presentes no polímero quando comparados aos monômeros de βCD.

#### 2.3.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica

As curvas de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) utilizadas para obtenção dos parâmetros de interação termodinâmica do sistema PROP:βCD foram obtidas utilizando-se o microcalorímetro NanoITC 2G TA Instruments, pertencente ao DQ-UFMG. Os dados foram processados através de ajuste não linear obtido no software NanoAnalyzer fornecido pelo fabricante do equipamento.

### **2.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmico**

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizadas para caracterizar o sistema PROP:βCD foram realizadas em equipamento Zetasizer ZS NanoSeries da Malvern Instruments pertencente ao DQ-UFMG. As amostras foram submetidas a um feixe de laser He-Ne de comprimento de onda de 632,4 nm. Em todos os experimentos foi utilizada água Milli-Q® filtrada em membrana de 0,1 μm no preparo das soluções. Os dados obtidos foram analisados no software Zetasizer 6.20.

### **2.3.4 Espalhamento de Luz Estático**

As medidas de espalhamento de luz estático (SLS) utilizadas para caracterizar a poliβCD sintetizada foram realizadas em um equipamento de espalhamento de luz a ângulos múltiplos modelo comercial da Brookhaven Co., em colaboração com o Prof. Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Foi utilizado o método de Zimm para a obtenção dos parâmetros citados, no qual é medida a intensidade da luz espalhada por diferentes concentrações da solução polimérica a diferentes ângulos. Para tanto, foram preparadas soluções de poliβCD com concentrações variando de 0,4 a 5,0 g mL<sup>-1</sup>, as quais foram filtradas em membranas de 0,45 μm para posterior realização das medidas. A leitura da intensidade da luz espalhada foi determinada em uma faixa angular de 30 - 110° utilizando um passo de 10°. A água foi utilizada como padrão para a determinação da razão de Rayleigh e para o cálculo da constante óptica *K*. O incremento do índice de refração em função da concentração, necessário para determinação de *M<sub>w</sub>*, foi obtido em refratômetro diferencial, o qual é capaz de medir a diferença de índice de refração entre uma solução como uma função da concentração de soluto. Para este experimento as concentrações de solução polimérica variaram de 1 a 10 mg mL<sup>-1</sup>.

### **2.3.5 Espectrometria de Massas**

A técnica de espectrometria de massas foi utilizada para caracterizar o sistema PROP:βCD. Foi utilizado o espectrômetro Waters ACQUITY UPLC System acoplado com analisador do tipo triplo quadrupolo Xevo TQD e fonte de ionização por *Eletrospray* (ESI-MS) operando no modo positivo, pertencente ao DQ-UFMG. A voltagem do capilar e do cone foram respectivamente 3200 e 30 V, com temperatura de dessolvatação de 120°C e varredura de 100 a 2000 *m/z*. Todos os dados foram coletados e processados no software MassLynx 4.1.

### **2.3.6 Análise Térmica**

Os experimentos de Análise Termogravimétrica (TG/DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) foram obtidos simultaneamente em termobalança SDT Q600 TA Instruments, pertencente ao DQ-UFMG. Foi utilizada atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> com vazão aproximada de 50 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram pesadas em cadinho de alumina e aquecidas de 25 a 700 °C empregando-se uma razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. As curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram obtidas em termobalança DSC-50 Shimadzu pertencente ao DQ-UFMG. As amostras foram aquecidas em cadinhos de alumínio de -50 a 250 °C utilizando razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> sob atmosfera de N<sub>2</sub> com vazão aproximada de 50 mL min<sup>-1</sup>.

Os dados obtidos foram analisados no software TA Instruments Universal Analysis 2000 e posteriormente plotados utilizando o programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation. Foram obtidas curvas TG/DTG, DTA e DSC empregando-se as referidas técnicas de Análise Térmica descritas para os polímeros sintetizados a base de βCD, as fibras preparadas a base de polímeros sintetizados e comerciais, bem como para a βCD e os fármacos cloridrato de propranolol e cloridrato de daunorubicina.

### **2.3.7 Difração de Raios-X**

O perfil cristalográfico da poliβCD e das fibras poliméricas foram avaliados por difração de raios-X de pó (DRX) registrados no equipamento Rigaku Geiger-flex 2037 pertencente ao DQ-UFMG, utilizando-se tubo de cobre e radiação CuKα = 1,54051, em ângulos de 2θ variando de 4 a 60 graus e velocidade de varredura de 4θ min<sup>-1</sup>.

### **2.3.8 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos pela técnica de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100 Universal ATR Sampling Accessory do Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais Avançados da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI. As amostras foram posicionadas em uma placa superior com pequena janela de diamante e os espectros foram obtidos na região de 4000 - 650 cm<sup>-1</sup> resultantes das médias de 128 varreduras por amostra com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Os dados foram analisados no software Spectrum 6.1.0 fornecido pelo fabricante do equipamento e posteriormente plotados utilizando o programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

### **2.3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A morfologia das fibras poliméricas foi investigada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando o microscópio eletrônico FEG-QUANTA 200 FEI a 10 kV do Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram recobertas com uma camada de ouro de 5 nanômetros de espessura para permitir a análise superficial. O diâmetro das fibras foi determinado pela análise de 10 medidas de 3 diferentes micrografias e análise no software de visualização de imagens Image-J.

### **2.3.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A obtenção das fibras coaxiais foi investigada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) utilizando o microscópio eletrônico Tecnai G2-20 - SuperTwin FEI - 200 kV do Centro de Microscopia da UFMG. Para tanto uma fina camada de fibras foi depositada diretamente sobre as grades de cobre. As estimativas dos diâmetros interno e externo foram obtidas pelo software de visualização de imagens Image-J.

### **2.3.11 Ângulo de Contato**

As fibras poliméricas contendo cloridrato de propranolol foram caracterizadas quanto ao grau de afinidade pelas moléculas de água realizando-se medidas de ângulo de contato em equipamento KRUSS GmbH Germany, modelo FM40MK2 EasyDrop da Central Analítica do Instituto de Física e Química - UNIFEI. Para tanto foram realizadas 10 medidas do ângulo de contato em 5 gotas depositadas nas superfícies das fibras (10  $\mu$ L de volume de gota). Assim, foram investigados possíveis efeitos nas características de hidrofília/hidrofobia causados pela obtenção de fibras uniaxiais e coaxiais na ausência ou presença de cloridrato de propranolol. Também foram avaliados os efeitos causados pelo processo térmico utilizado para promover ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas.

### **2.3.12 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível**

A determinação da citotoxicidade *in vitro* da poli $\beta$ CD sintetizada e das fibras de PLGA foi realizada pelo método do MTT após a leitura da solução de azul de formazan por Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível em espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan Spectrum MCC/340 a 570 nm, pertencente ao DQ-UFMG.

A quantificação das amostras obtidas no estudo da cinética de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol presente nas fibras poliméricas à base de PMAA e poli $\beta$ CD foi realizada por Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível em

espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan Spectrum MCC/340 a 290 nm, pertencente ao DQ-UFMG.

A quantificação das amostras obtidas no estudo da cinética de liberação *in vitro* de daunorubicina presente nas fibras poliméricas a base de PLGA foi realizada por Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível em espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan Spectrum MCC/340 a 475 nm, pertencente ao DQ-UFMG.

# ***CAPÍTULO 3***

## ***Resultados e Discussão***

---

*Sistema supramolecular formado por cloridrato de  
propranolol e  $\beta$ -ciclodextrina*

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados da preparação e caracterização do sistema supramolecular do tipo hóspede-hospedeiro formado pela interação entre cloridrato de propranolol e  $\beta$ -ciclodextrina, bem como do processo de auto-associação desses compostos. Para a caracterização desses sistemas foram utilizadas técnicas físico-químicas de análise em solução como ressonância magnética nuclear, calorimetria de titulação isotérmica, espectrometria de massa e espalhamento de luz dinâmico.

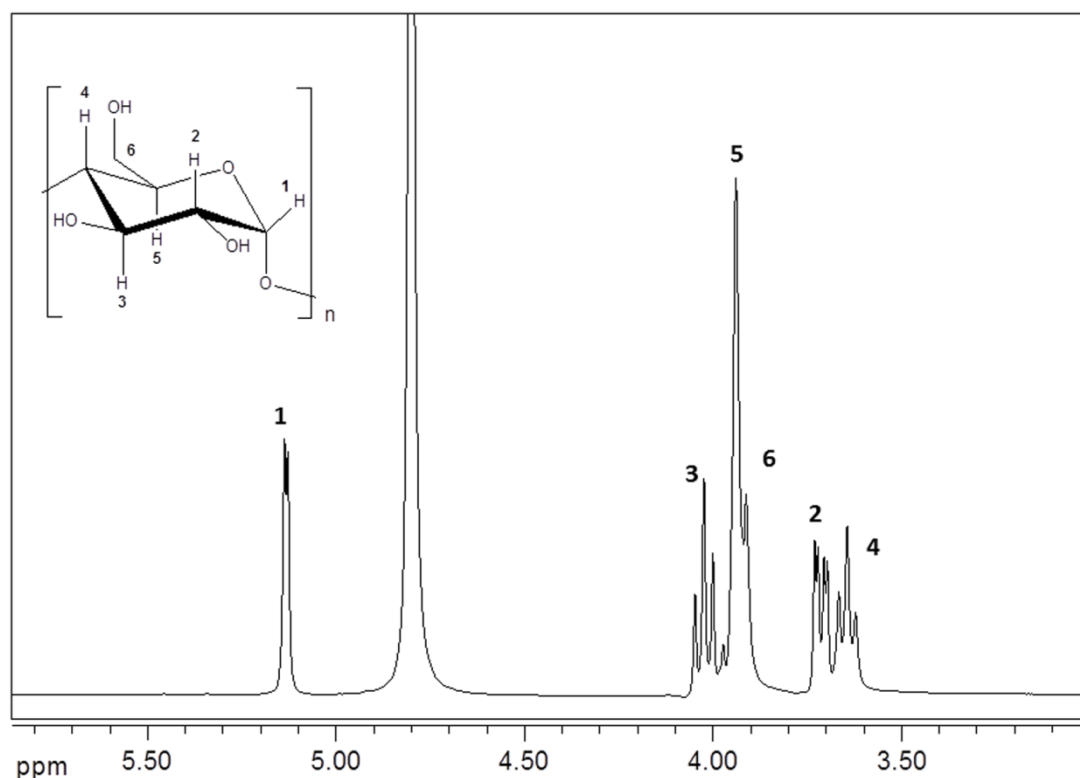
#### 3.1 Ressonância Magnética Nuclear

Experimentos uni- e bidimensionais de RMN foram utilizados para a caracterização dos materiais de partida,  $\beta$ CD e PROP. O emprego destas técnicas teve como objetivo a caracterização estrutural das moléculas hóspede e hospedeira.

O espectro de hidrogênio em  $D_2O$  a 400 MHz para a  $\beta$ -ciclodextrina é apresentado na Figura 3.1. Os sinais dos hidrogênios observados para a  $\beta$ CD, bem como os respectivos deslocamentos químicos na região de 3,91 a 5,13 ppm estão de acordo com aqueles relatados na literatura, confirmando assim a estrutura da amostra [98]. Os sinais de ressonância dos hidrogênios das hidroxilas não são observados devido à troca espontânea destes com átomos de deutério do solvente. As atribuições e valores de deslocamento químico estão relacionados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1 - Valores de deslocamento químico ( $\delta/ppm$ ) para os hidrogênios da  $\beta$ CD ( $D_2O$ , 400 MHz).**

<b>HIDROGÊNIOS</b>	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>
<b><math>\delta/ppm</math></b>	5,13	3,72	4,02	3,64	3,94	3,91



**Figura 3.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para a  $\beta\text{CD}$  com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).**

Para a elucidação estrutural do fármaco cloridrato de propranolol foram utilizadas as técnicas de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT,  $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMBC. Em todos os experimentos foi utilizado  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente e conforme mencionado anteriormente os hidrogênios referentes às hidroxilas e aos grupos amino não são visualizados devido à troca espontânea por átomos de deutério do solvente. A Figura 3.2 apresenta o espectro de hidrogênio a 400 MHz para o cloridrato de propranolol. Com base na análise conjunta dos espectros de RMN, obtidos pelas técnicas descritas acima, foram realizadas as atribuições dos sinais de hidrogênio da molécula, os quais constam na Tabela 3.2 com os respectivos valores de deslocamento químico. Os demais espectros utilizados para realizar as atribuições encontram-se no ANEXO 1. Os dados obtidos estão de acordo com aqueles relatados na literatura, confirmando assim a estrutura da amostra [99].

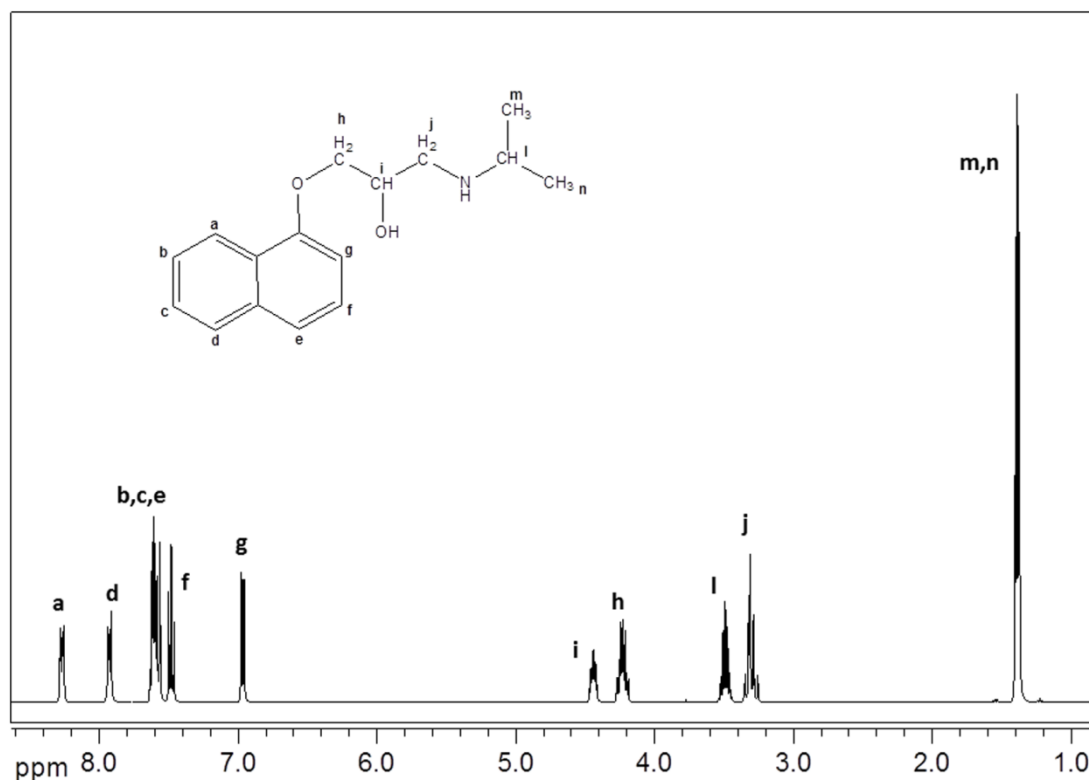


Figura 3.2 - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H para o cloridrato de propranolol (D<sub>2</sub>O,400 MHz).

Tabela 3.2 - Valores de deslocamento químico ( $\delta/ppm$ ) para os hidrogênios do cloridrato de propranolol (D<sub>2</sub>O, 400 MHz).

HIDROGÊNIOS	$\delta/ppm$
Ha	8,27
Hb, Hc, He	7,60
Hd	7,93
Hf	7,48
Hg	6,96
Hh	4,23
Hi	4,44
Hj	3,31
Hi	3,49
Hn, Hm	1,39

Com o objetivo de verificar a existência de interação intermolecular entre a  $\beta$ -ciclodextrina e o cloridrato de propranolol e ainda propor a orientação molecular do fármaco dentro da cavidade da CD, foram realizados experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e bidimensionais  $^1\text{H}/^1\text{H}$  ROESY. As Figuras 3.3 e 3.4 apresentam os espectros de hidrogênio para o sistema PROP: $\beta$ CD em  $\text{D}_2\text{O}$  a 400 MHz e a Tabela 3.3 mostra os valores de deslocamentos químicos para os sinais dos hidrogênios do PROP puro e na presença de  $\beta$ CD.

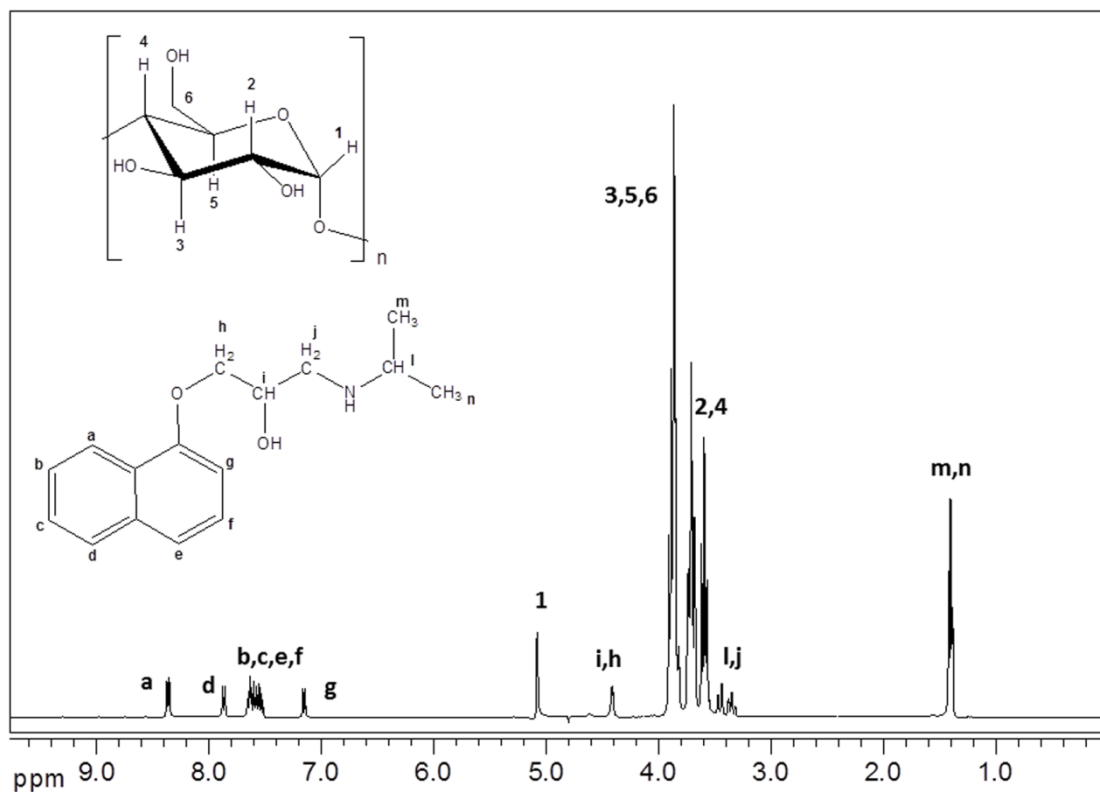


Figura 3.3 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o sistema PROP: $\beta$ CD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).

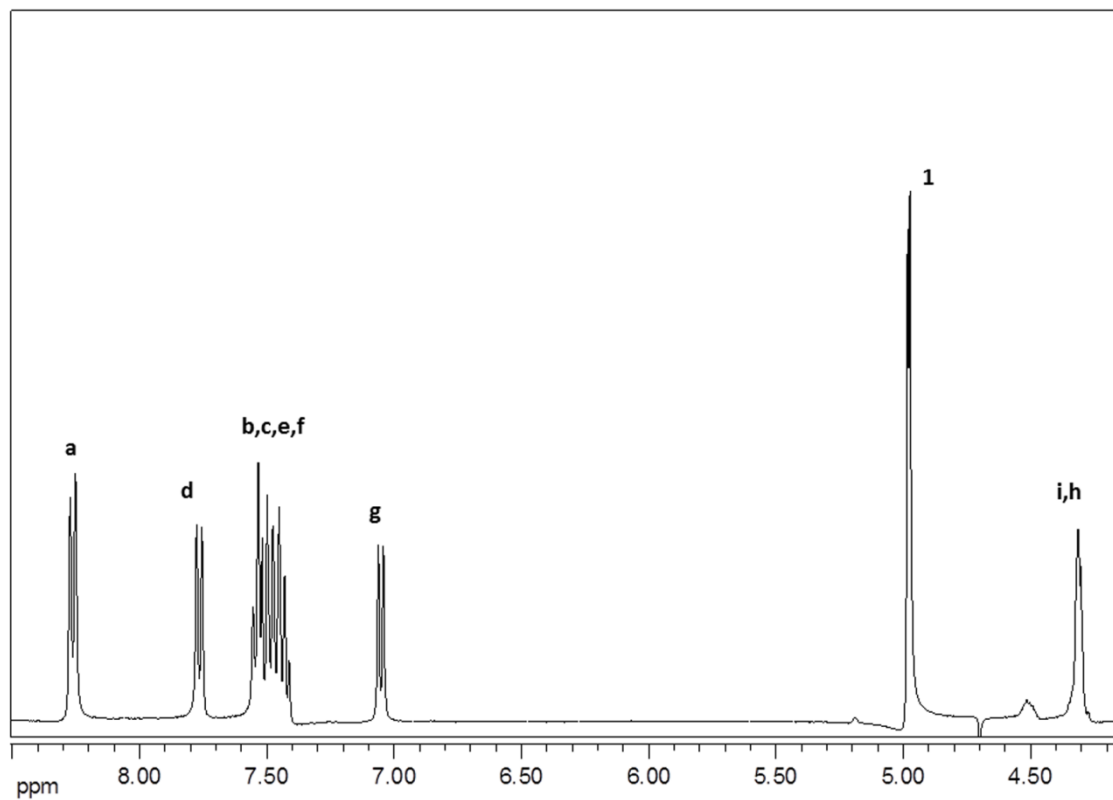


Figura 3.4 - Seção expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o sistema PROP: $\beta$ CD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).

Tabela 3.3 - Valores de deslocamento químico ( $\delta/ppm$ ) para os hidrogênios do cloridrato de propranolol puro e na presença de  $\beta$ CD ( $D_2O$ , 400 MHz).

DESLOCAMENTO QUÍMICO $\delta/ppm$			
Hidrogênios	PROP	PROP: $\beta$ CD	$\Delta\delta/ppm$
Ha	8,27	8,36	0,09
Hb, Hc, He	7,60	7,60 (coalesceram com Hf)	0,00
Hd	7,93	7,86	-0,07
Hf	7,48	7,60 (coalesceu com Hb, Hc, He)	0,12
Hg	6,96	7,15	0,19
Hh	4,23	4,41 (coalesceu com Hi)	0,18
Hi	4,44	4,41 (coalesceu com Hh)	0,04
Hj	3,31	3,35	0,04
Hi	3,49	3,45	0,04
Hn,m	1,39	1,39	0,00

Comparando-se os valores de deslocamento químico para o PROP puro e em presença de  $\beta$ CD, pode-se observar que as maiores variações são para os hidrogênios aromáticos Ha; Hb, Hc, He; Hd; Hf e Hg, bem como o hidrogênio Hh. Foram observadas também mudanças no perfil do espectro devido à coalescência dos sinais de Hb, Hc, He, Hf e Hh, Hi. O fenômeno de complexação promove perturbações no microambiente químico e magnético dos hidrogênios das moléculas envolvidas, alterando a distribuição eletrônica sobre esses núcleos que se expressa no espectro como uma variação de deslocamento químico e na alteração do perfil do sinal [100-102]. Sendo assim, essas modificações no espectro são os primeiros indícios da ocorrência do processo de complexação. As variações no deslocamento químico podem ser limitadas a décimos de *ppm*, já que sistemas hóspede-hospedeiro são constituídos por interações não-covalentes [98]. De acordo com os dados apresentados pode-se dizer que o anel aromático da molécula de PROP pode estar incluído na cavidade da  $\beta$ CD.

Experimentos bidimensionais, como  $^1H/^1H$  ROESY, se baseiam no efeito nuclear Overhauser e permitem determinar átomos de hidrogênios que estão espacialmente próximos. Assim, interações dipolares a curtas distâncias (inferiores a 5Å) entre os hidrogênios do fármaco e das ciclodextrinas podem ser determinadas, sugerindo a geometria do composto

de inclusão formado em solução [23, 103]. As Figuras 3.5 e 3.6 apresentam o mapa de contorno 2D ROESY para o sistema PROP:βCD em D<sub>2</sub>O a 400 MHz.

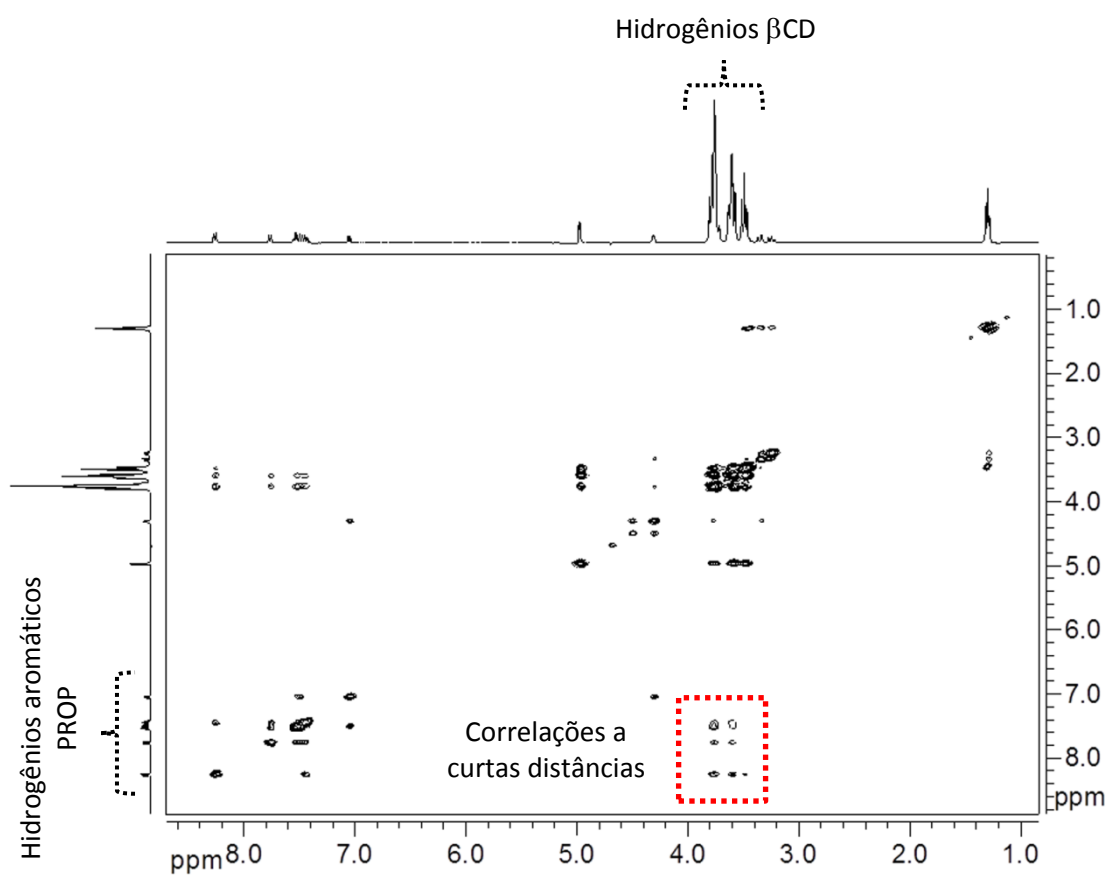
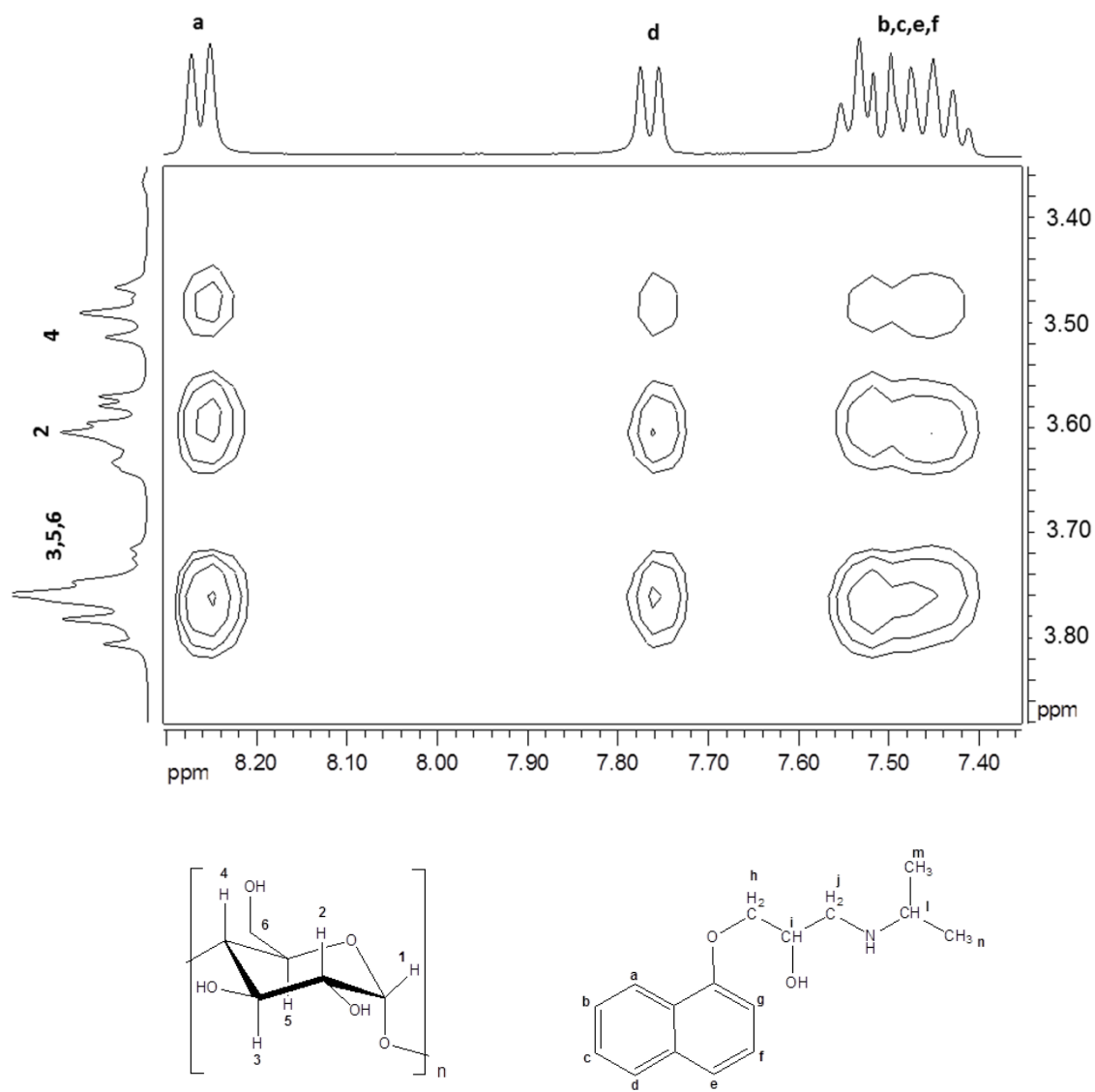


Figura 3.5 - Mapa de contorno 2D ROESY para o sistema PROP:βCD (D<sub>2</sub>O, 400 MHz).



**Figura 3.6 - Seção expandida do mapa de contorno 2D ROESY para o sistema PROP:βCD (D<sub>2</sub>O, 400 MHz).**

Analisando os mapas de contorno podem-se observar correlações a curtas distâncias entre os hidrogênios aromáticos H<sub>a</sub>; H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub> e H<sub>d</sub> do cloridrato de propranolol (região entre 8,36 a 7,60 ppm) e os hidrogênios H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> e H<sub>6</sub> da (região entre 4,02 a 3,91 ppm), confirmando a formação do sistema hóspede-hospedeiro PROP:βCD, no qual a região aromática da molécula de PROP encontra-se incluída na cavidade da β-ciclodextrina. Os hidrogênios aromáticos do cloridrato de propranolol também exibem correlações espaciais com e os hidrogênios H<sub>2</sub> e H<sub>4</sub> da βCD, indicando que o fármaco também interage com a parte

externa do macroclico. Estes resultados sugerem a formação de diferentes sistemas hóspede-hospedeiro de PROP:βCD com proporções maiores que 1:1, já que moléculas de PROP interagem tanto com a parte interna como externa da βCD. Resultados semelhantes já foram reportados pelo presente grupo de pesquisa para sistemas formados por β-ciclodextrina e fármacos como diacetato de clorexidina e ampicilina sódica, nos quais a técnica de RMN também sugeriu a formação de agregados moleculares, que foram posteriormente confirmados através do uso de outras técnicas analíticas, tais como a calorimetria de titulação isotérmica, espectrometria de massas e espalhamento de luz dinâmico [23, 26].

### 3.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Após a realização de análises por RMN, nas quais foi investigada e confirmada a formação do sistema hóspede-hospedeiro PROP:βCD, torna-se de suma relevância avaliar os parâmetros termodinâmicos que regem tal interação, bem como a possível existência de superestruturas em solução. A calorimetria de titulação isotérmica é uma ferramenta poderosa utilizada no estudo dos processos de interação intermolecular entre moléculas convidadas e ciclodextrinas, na qual se pode obter em um único experimento os valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ), variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), variação da entropia ( $\Delta S$ ), bem como a constante de associação ( $K_{ass}$ ) e a estequiometria do sistema ( $n$ ) [104, 105].

Esta técnica possui como fundamento a medida direta do fluxo de calor gerado em qualquer processo reacional após a ocorrência de quebra e formação de ligações ou interações intermoleculares entre as espécies. Em um típico experimento de ITC, alíquotas de titulante são adicionadas em uma cela isotérmica que contém um volume conhecido de titulado. Caso as espécies presentes possam interagir, haverá fluxo de calor após a adição de alíquotas de titulante, o qual é monitorado ao longo do tempo [106]. Como todo o processo é realizado a pressão constante, pode-se dizer que o fluxo de calor mensurado durante as injeções é igual ao valor de  $\Delta H$  parcial de injeção. Através do ajuste não-linear das curvas de titulação, o qual é realizado pelo software do equipamento e é conhecido como isoterma de Wiseman, podem ser obtidos os valores  $\Delta H$  do processo,  $K_{ass}$  e a estequiometria do sistema  $n$ . Utilizando as equações clássicas da Termodinâmica 3.1 e 3.2, é possível determinar também os valores de  $\Delta G$  e o termo  $T\Delta S$  [107].

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Eq. 3.1}$$

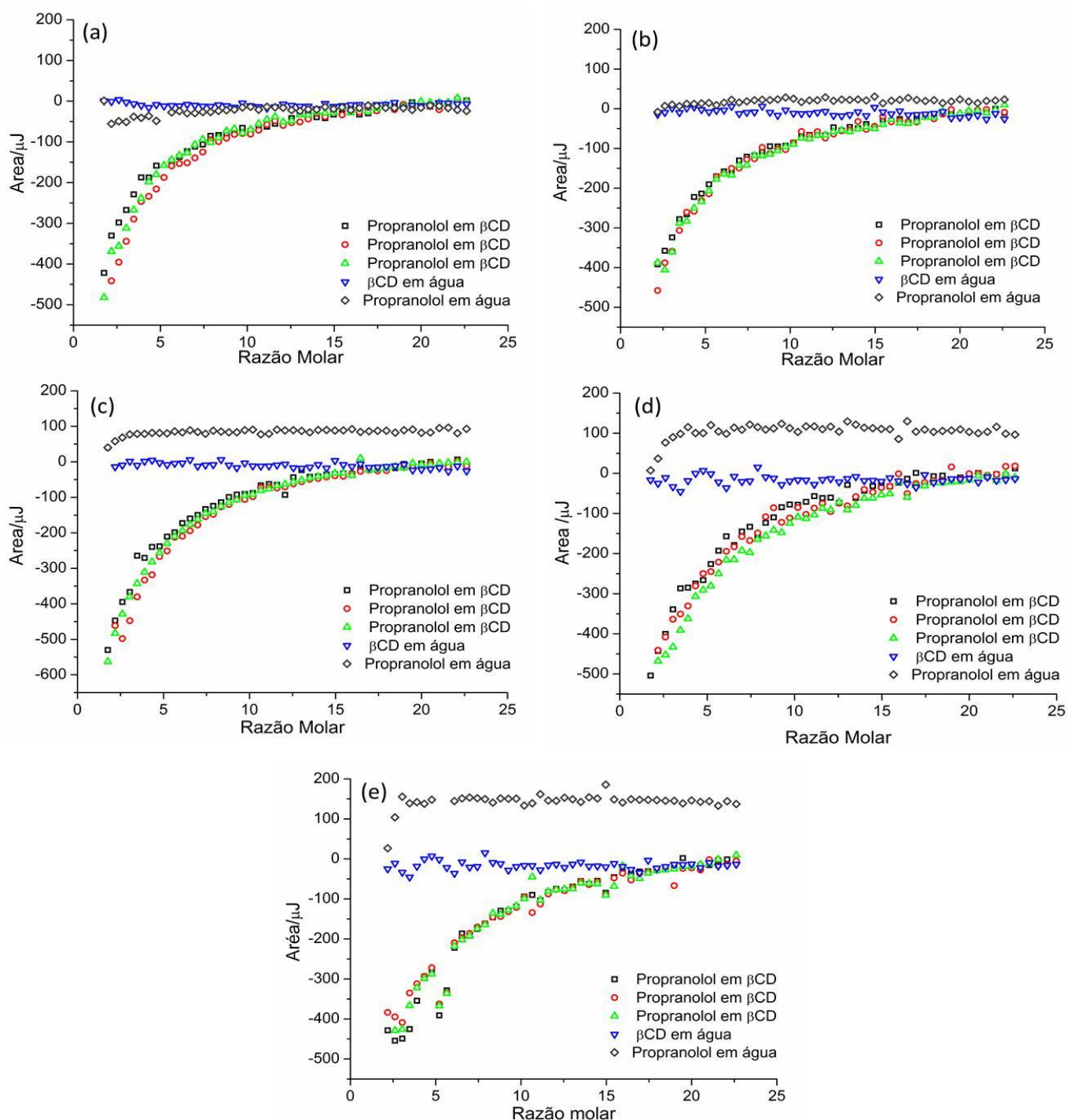
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. 3.2}$$

Com o intuito de avaliar a influência da temperatura no processo de inclusão, os experimentos de calorimetria foram realizados variando-se esta condição. De acordo com estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, o sistema formado por hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e o fármaco anti-hipertensivo losartan potássico, o qual demonstrou ser mais eficiente no controle da pressão arterial quando comparado ao fármaco livre, apresentou mudanças nos parâmetros de interação termodinâmica em função da temperatura, principalmente relacionadas à constante de associação e aos fatores entálpicos e entrópicos. Mais ainda, recentemente, foi investigado pelo grupo o sistema formado pelo fármaco antidepressivo cloridrato de sertralina e  $\beta$ -ciclodextrina, no qual os compostos de inclusão foram preparados por diversos métodos e o processo de inclusão foi monitorado por experimentos de RMN e calorimetria ambos em função da temperatura [108].

As respectivas curvas de titulação de PROP em água e de  $\beta$ CD em água (brancos) foram obtidas e subtraídas das curvas do sistema PROP: $\beta$ CD. Tal procedimento tem por objetivo minimizar os efeitos de diluição do titulante no solvente, explicitando apenas as interações entre o titulante e o titulado [109]. As curvas de titulação calorimétrica para o PROP (80 mmol L<sup>-1</sup>) em  $\beta$ CD (1 mmol L<sup>-1</sup>) após subtração dos brancos, bem como para PROP em água e  $\beta$ CD em água foram obtidas a diferentes temperaturas: 278,15; 288,15; 298,15; 308,15 e 318,15 K. O calor liberado ou absorvido após cada injeção de titulante é determinado pela integração dos picos gerados em relação ao tempo e é utilizado para traçar os gráficos em função da razão molar de PROP/ $\beta$ CD, conforme apresentado na Figura 3.7.

Analisando o perfil de diluição da  $\beta$ CD em água, pode-se observar que as curvas apresentam uma variação de entalpia próxima de zero em todas as temperaturas avaliadas. Considerando que, do ponto de vista entálpico, a formação de interações não covalentes é um processo exotérmico ( $\Delta H < 0$ ), sendo que a quebra dessas interações é um processo endotérmico ( $\Delta H > 0$ ), pode-se inferir que a  $\beta$ CD não tende a se agregar na concentração em estudo, ou o calorímetro não foi capaz de mensurar o fluxo de calor envolvido no processo. Com relação ao perfil de diluição do PROP em água pode-se observar que o mesmo sofre variações à medida que a temperatura aumenta. Inicialmente a 278,15 K verifica-se um leve perfil exotérmico nas primeiras injeções e posteriormente uma variação de entalpia próxima de zero, semelhante à curva obtida a 288,15 K, indicando que a baixas temperaturas o fármaco não tende a se agregar em solução. Com o aumento gradativo da temperatura, verifica-se o aumento da predominância do perfil endotérmico para os demais sistemas a 298,15; 308,15 e 318,15 K, respectivamente. Tal fato sugere que esse comportamento pode estar associado à presença de agregados moleculares de PROP em solução, os quais são dissociados à medida

que a diluição se processa na cela reacional. Sendo assim, o aumento de temperatura é um parâmetro que influencia diretamente a agregação do fármaco em solução.



**Figura 3.7 - Curvas de titulação calorimétrica para PROP ( $80 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em  $\beta\text{CD}$  ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) após subtração dos brancos, bem como para PROP em água e  $\beta\text{CD}$  em água: (a) 278,15; (b) 288,15; (c) 298,15; (d) 308,15; (e) 318,15 K.**

Através do ajuste não linear das curvas de titulação de PROP em  $\beta$ CD, foi possível obter os parâmetros físico-químicos de interação, bem como a constante de associação e a estequiometria do sistema, os quais são apresentados na Figura 3.8. O processo de inclusão é espontâneo em todas as titulações realizadas, conforme demonstrado pela variação do valor de energia livre de Gibbs, o qual apresenta valores negativos, Figura 3.8(a). Não são verificadas grandes variações no valor de  $\Delta G$  em função da temperatura, sendo que o valor mínimo foi de  $-13,64 \text{ kJ mol}^{-1}$  a 278,15 K e o máximo de  $-16,08 \text{ kJ mol}^{-1}$  a 318,15 K.

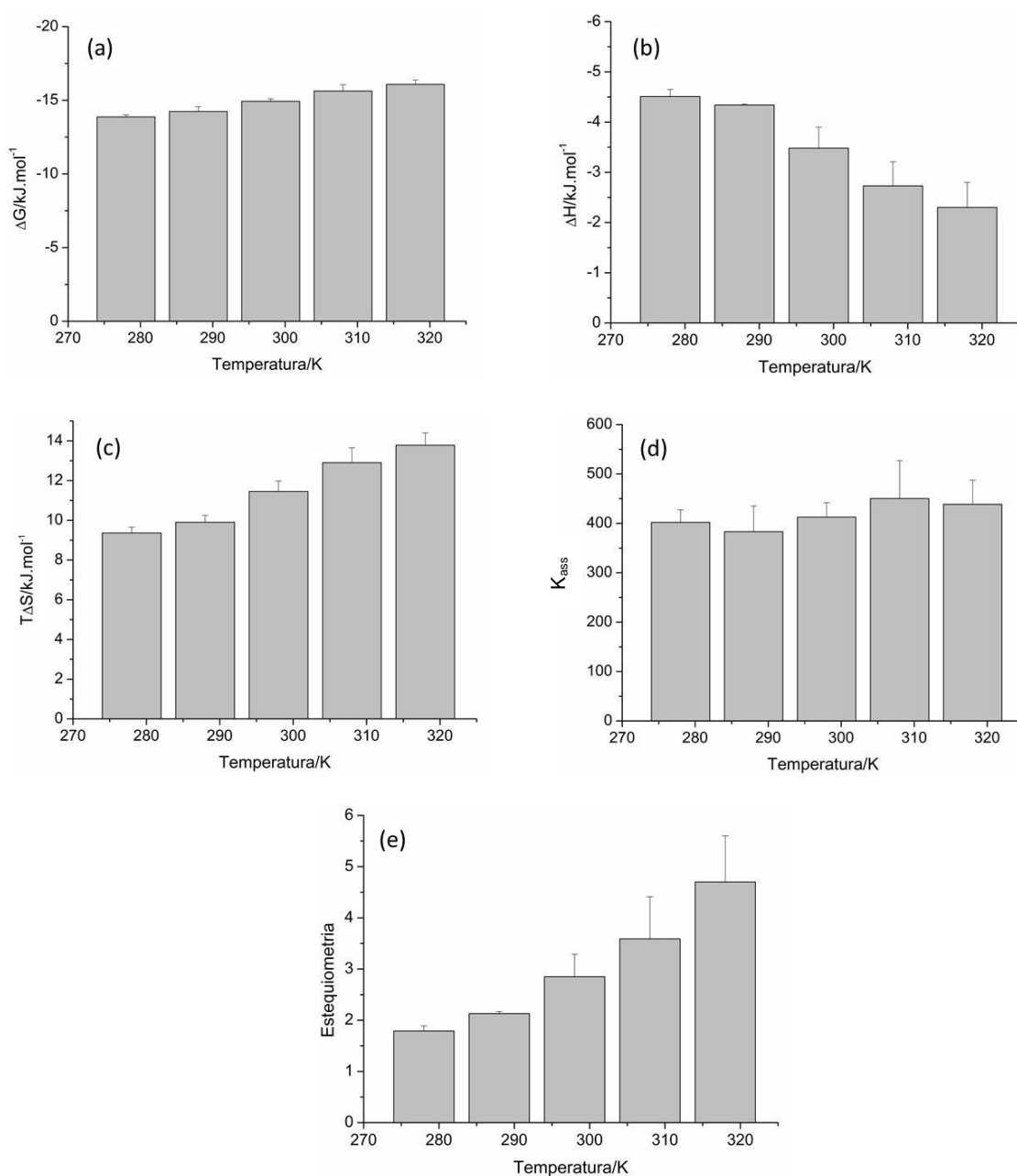


Figura 3.8 - Parâmetros termodinâmicos de interação para o sistema cloridrato de propranolol em  $\beta$ -ciclodextrina: (a)  $\Delta G$ ; (b)  $\Delta H$ ; (c)  $T\Delta S$ ; (d)  $K_{\text{ass}}$ ; (e) estequiometria.

As titulações exibiram perfil exotérmico e foram acompanhadas pelo aumento de entropia do sistema, como apresentado na Figura 3.8(b)(c). A formação do composto de inclusão está geralmente associada a valores negativos de entalpia e estes resultados podem ser atribuídos a interações do tipo hóspede-hospedeiro que são estabelecidas entre o fármaco e a macromolécula, conforme já descrito na literatura para sistemas similares [19, 110-112]. Assim, a saída de moléculas de água do interior da cavidade e ainda a formação de interações cooperativas, tais como ligações de hidrogênio, bem como interações eletrostáticas são responsáveis pelo perfil exotérmico observado [19].

A contribuição entrópica pode estar associada à dessolvatação das moléculas hóspedes durante a complexação, formação de interações hidrofóbicas e ainda à possível existência de mais de um tipo de complexo de inclusão em equilíbrio, aumentando o número de espécies existentes em solução [101]. Com relação à influência da temperatura no processo de complexação, foi observado o aumento do termo  $T\Delta S$  de  $9,36 \text{ kJ mol}^{-1}$  a  $278,15 \text{ K}$  para  $13,78 \text{ kJ mol}^{-1}$  a  $318,15 \text{ K}$ . Verifica-se, então uma compensação entre os valores entálpicos e entrópicos, sendo essa responsável pela manutenção dos valores de  $\Delta G$  nos níveis anteriormente citados.

Tradicionalmente, interações hidrofóbicas são governadas por entropia e tal processo ocorre quando as contribuições entálpicas são menores que as entrópicas, ou seja,  $|\Delta H| < |T\Delta S|$ . Por outro lado, interações de van der Waals são usualmente dirigidas por entalpia e podem ser ou não auxiliadas por entropia,  $|\Delta H| > |T\Delta S|$  [102, 104]. Assim, pode-se dizer que o processo de complexação de PROP em  $\beta\text{CD}$  é dirigido por entropia, mediado por interações hidrofóbicas e sofre acréscimo com o aumento da temperatura, pois a contribuição do termo  $T\Delta S$  é superior à pequena contribuição de  $\Delta H$  em todas as temperaturas estudadas.

Os valores da constante de associação para os sistemas estudados não sofreram grandes variações com o aumento da temperatura e estes são da ordem de  $K_{\text{ass}} = (367,7 \pm 61,9)$  a  $278,15 \text{ K}$ ; e  $K_{\text{ass}} = (438,6 \pm 48,8)$  a  $318,15 \text{ K}$  conforme mostrado na Figura 3,8(d). Os dados demonstram uma fraca interação do fármaco com a cavidade da  $\beta\text{CD}$ , contudo estão de acordo com os reportados na literatura para compostos de inclusão, os quais podem variar de 0, na ausência de interação, a aproximadamente 100.000 para substâncias que exibem interações extremamente fortes com as ciclodextrinas [27, 113].

Analisando a Figura 3.8(e), verifica-se que os coeficientes estequiométricos que correspondem à proporção de PROP: $\beta\text{CD}$  em solução aumentam com a elevação da temperatura. Os valores variam de  $n = 1,79$  a  $278,15 \text{ K}$ , que sugere a formação de compostos do tipo 2:1, até  $n = 4,70$  a  $318,15 \text{ K}$ , que sugere a formação de compostos do tipo 4:1. Os dados obtidos para as proporções entre fármaco e  $\beta\text{CD}$  nos agregados não correspondem a

números inteiros, sugerindo a existência de mais de um tipo de composto de inclusão em equilíbrio em solução aquosa. Tal fato vem de encontro com os baixos valores de  $K_{ass}$  obtidos para os sistemas, que resultam na presença de muitas espécies em solução. Dessa forma, os dados apresentados demonstram a auto-associação dos compostos de inclusão em solução. A formação de superestruturas está associada ao aumento de forças atrativas entre as moléculas hóspedes e as hospedeiras com o aumento da temperatura.

É importante mencionar que as interações hidrofóbicas mencionadas, as quais são responsáveis pelo aumento de entropia do sistema, também estão associadas ao processo de agregação, uma vez que a formação de agregados ocasiona a liberação de moléculas de água que estavam anteriormente solvatando às cadeias carbônicas e, por isso estavam imobilizadas ao redor da superfície molecular.

### 3.3 Espectrometria de Massas

Para confirmar o fenômeno de auto-associação exibido pelo sistema PROP:βCD observado nos experimentos de calorimetria e indicado pelo espectro de RMN 2D ROESY, foram realizadas análises por espectrometria de massas, já que esta técnica tem sido útil para avaliar qualitativamente as espécies presentes em solução, incluindo os compostos de inclusão e outras superestruturas [23, 110, 114]. A Figura 3.9 apresenta os espectros de massa para o cloridrato de propranolol, β-ciclodextrina e composto de inclusão PROP:βCD. Analisando o espectro de massas para o PROP, pode ser observado o sinal referente ao íon quasi-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 260,1$  conforme relatado anteriormente na literatura [115]. Além disso, verifica-se a presença do dímero  $[2PROP+H]^+$  com  $m/z = 521,4$  e de uma série homóloga de agregados de  $Cl_{n-1}PROP_n$ , sendo que  $[2PROP+Cl]^+$  possui  $m/z = 555,4$ ;  $[3PROP+2Cl]^+$  com  $m/z = 850,4$  e  $[4PROP+3Cl]^+$  com  $m/z = 1145,5$ . Estes dados corroboram os resultados obtidos por titulação calorimétrica, nos quais o calor de diluição endotérmico sugere que o fármaco esteja agregado em solução, possivelmente através de ligações de hidrogênio, e se dissocie durante a diluição. O espectro para a βCD apresenta o sinal para o íon quasi-molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z = 1135,4$  conforme relatado em trabalhos anteriores [93].

Para o sistema formado por fármaco e β-ciclodextrina são observados os sinais referentes ao íon quasi-molecular para o PROP, βCD e para compostos supramoleculares PROP:βCD 1:1 com  $m/z = 1394,8$  e PROP:βCD+Cl 2:1 com  $m/z = 1690,8$ . Embora outros sistemas supramoleculares de maior ordem não tenham sido observados, estes resultados também estão de acordo com os obtidos por titulação calorimétrica, nos quais foram identificados não só complexos 1:1, mas também outras superestruturas. Considerando que a técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* utiliza altas temperaturas e voltagens

para a determinação da razão  $m/z$  das substâncias analisadas, pode-se dizer que os compostos supramoleculares de maior ordem podem ser mais sensíveis a tais condições e, dessa forma, não foram observados.

Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa demonstraram a capacidade de identificação de compostos supramoleculares formados por  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e fármacos de diversas classes tais como anti-hipertensivos (losartan potássico) antimicrobianos (diacetato de clorexidina) e agentes contra leishmaniose (isetionato de pentamidina) [23, 100, 110]. Para o sistema formado por losartan potássico e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina foi identificado apenas o composto de inclusão sem a presença de sistemas de maior ordem. Contudo, para os sistemas formados por diacetato de clorexidina e isotionato de pentamidina com  $\beta$ -ciclodextrina foram obtidas superestruturas em solução nas proporções de 1 molécula de fármaco para até 4 moléculas de  $\beta$ CD.

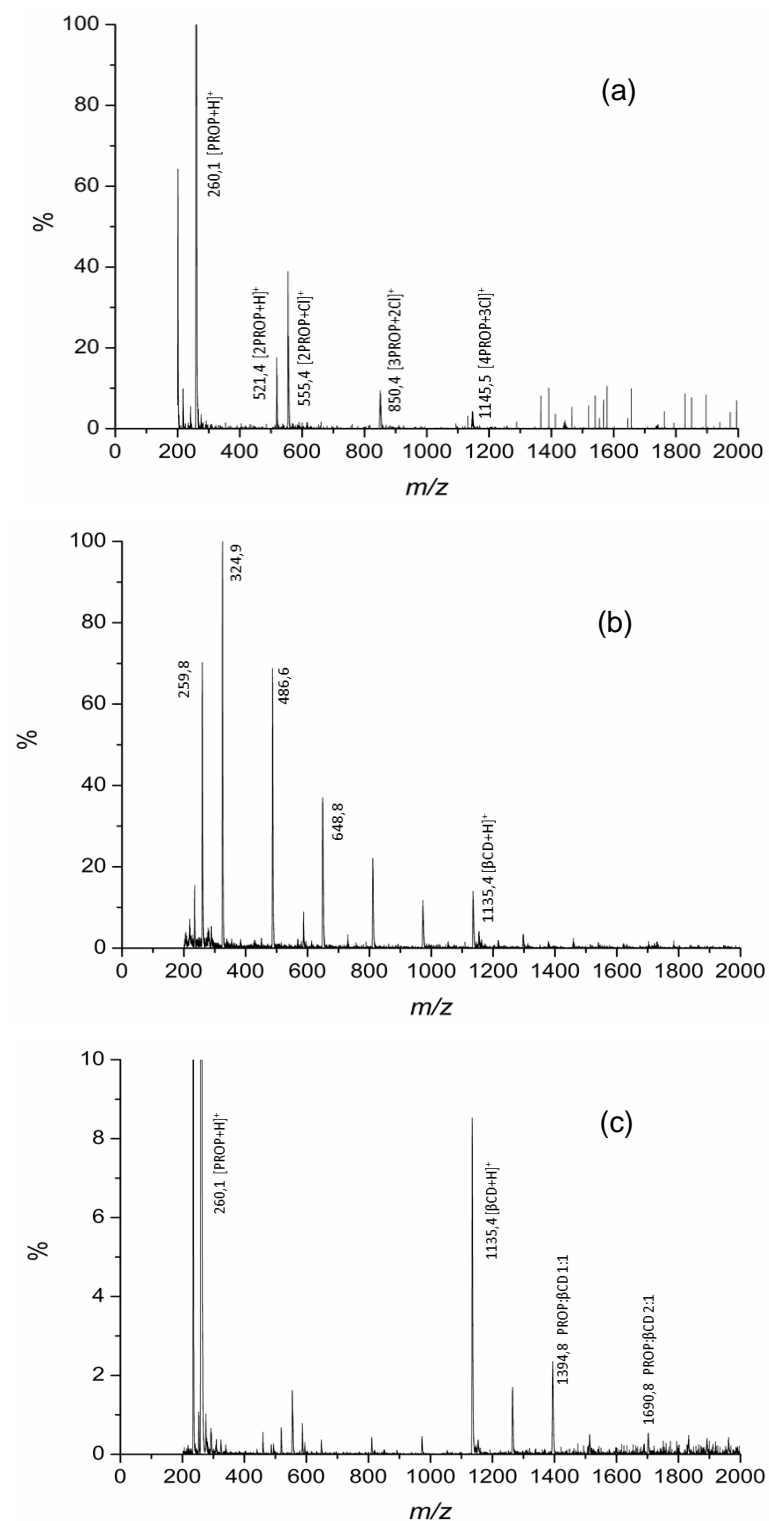


Figura 3.9 - Espectros de massa obtidos em fonte de ionização por *electrospray* operando em modo positivo para: (a) o cloridrato de propranolol, (b) β-ciclodextrina e (c) composto de inclusão PROP:βCD.

### 3.4 Espalhamento de luz dinâmico

Para determinar o raio hidrodinâmico dos agregados formados no processo de auto-associação dos compostos de inclusão de PROP: $\beta$ CD em solução aquosa, foram realizadas titulações empregando a mesma faixa de razão molar dos experimentos de calorimetria, que foram monitoradas a 298,15 K por espalhamento de luz dinâmico. Assim, para cada ponto das titulações foram obtidas as distribuições da população de agregados em função do raio hidrodinâmico dos mesmos. A Figura 3.10 apresenta os histogramas para as titulações de PROP em  $\beta$ CD, bem como para o cloridrato de propranolol em água e  $\beta$ -ciclodextrina em água, em três faixas pré-determinadas de razão molar de PROP/ $\beta$ CD, sendo que a primeira faixa compreende o início da titulação de 0,09 a 1,76; a segunda compreende a faixa intermediária da titulação de 8,80 a 13,03; e a última faixa se refere ao final da titulação de 20,52 a 22,62.

Pode-se perceber que após a adição dos primeiros incrementos da solução de PROP em solução de  $\beta$ CD, verifica-se a presença de agregados da ordem de 0,6 a 1,8 nm (valor máximo da distribuição: 1,3 nm), semelhantes à solução de  $\beta$ CD pura, a qual possui agregados com tamanhos da ordem de 0,5 a 3,5 nm (valor máximo da distribuição: 1,5 nm) nas três faixas de razão molar estudadas. O valor do diâmetro médio encontrado para a solução de  $\beta$ CD livre está de acordo com os descritos na literatura e são referentes à molécula de  $\beta$ CD livre, bem como pode estar associado à interação de duas ou três moléculas, formando dímeros ou trímeros em solução [26, 116].

Na faixa intermediária da titulação de PROP em  $\beta$ CD, verifica-se que a distribuição de tamanho é bastante larga, variando de 50 a 300 nm, com aspecto bimodal e pontos máximos em 122 e 165 nm. Esta variação sugere a existência de mais de um tipo de complexo de inclusão em equilíbrio, aumentando o número de espécies existentes em solução que se manifestam mais intensamente nesta região. Diferentes valores de tamanhos de agregados são observados para a diluição de PROP em água nesta mesma faixa de razão molar, na qual a maior distribuição de agregados corresponde a 300 até 350 nm (valor máximo da distribuição: 300 nm). Tal fato demonstra a existência de espécies distintas nas duas titulações avaliadas.

Ao final da adição de PROP em  $\beta$ CD pode-se observar que a maior distribuição de agregados corresponde a 220 até 300 nm (valor máximo da distribuição: 250 nm). Valores distintos são observados para a diluição de PROP em água, na qual a maior distribuição de agregados ainda corresponde a 300 até 350 nm (valor máximo da distribuição: 300 nm). Tal fato sugere que os agregados de PROP já presentes em solução podem ser rompidos quando são adicionados à solução de  $\beta$ CD, resultando na formação de outras espécies de nanoagregados oriundos da inclusão de moléculas de PROP nas cavidades das ciclodextrinas.

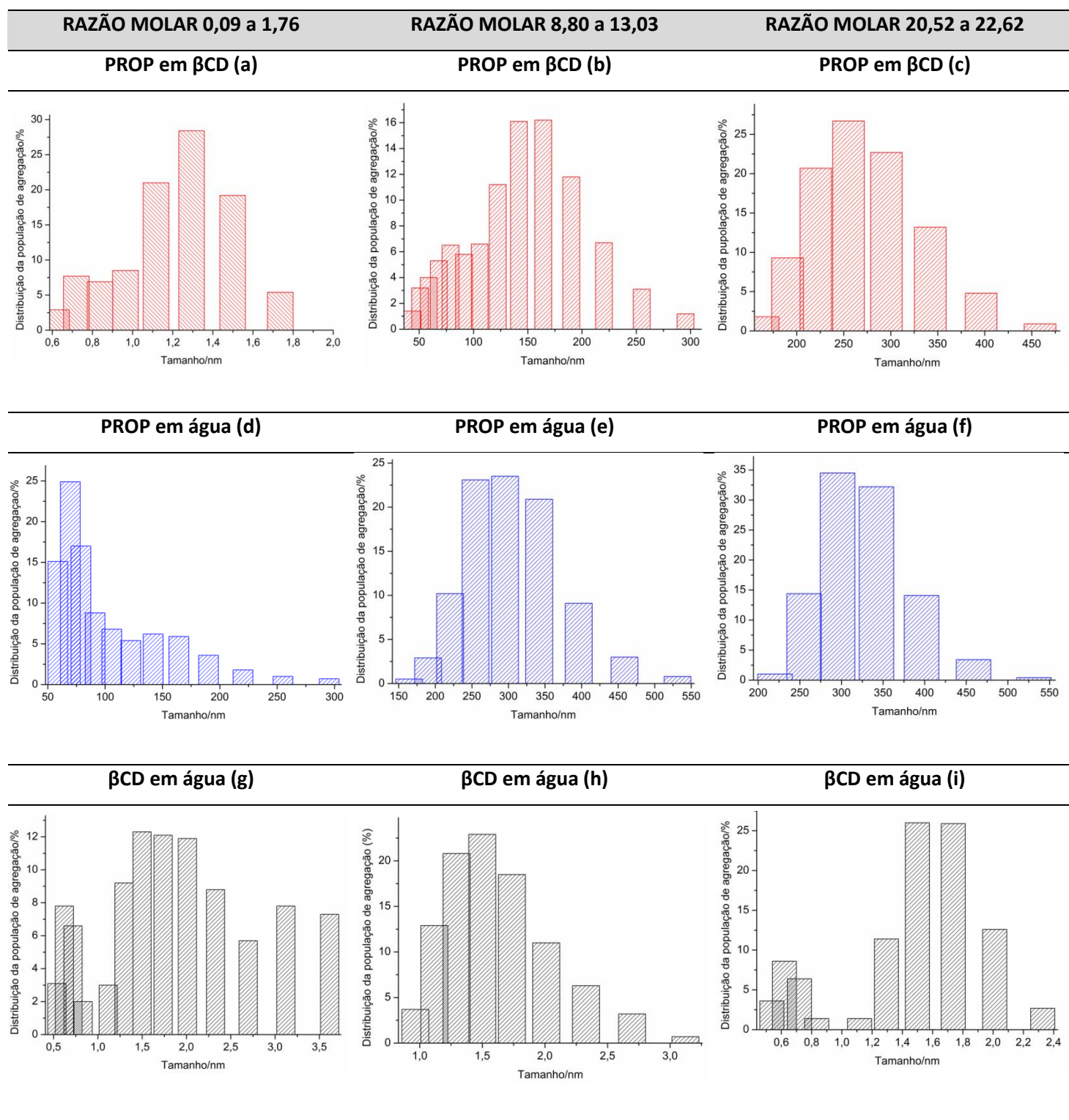


Figura 3.10 - Distribuição da população de agregação para a titulação de PROP em  $\beta$ CD, PROP em água e  $\beta$ CD em água: razão molar 0,09 a 1,76 (a), (d), (g); razão molar 8,80 a 13,03 (b), (e), (h); razão molar 20,52 a 22,62 (c), (f), (i).

Assim, para o sistema formado por  $\beta$ -ciclodextrina e cloridrato de propranolol pode-se confirmar a formação do composto de inclusão em solução, além de nanoagregados moleculares com proporções de até 4:1 PROP: $\beta$ CD. Os parâmetros de interação moleculares demonstraram a espontaneidade do processo de inclusão, a formação das superestruturas e como a temperatura influencia este processo. Os nanoagregados detectados apresentaram dimensões da ordem de 220 a 300 nm e massas moleculares compatíveis com sistemas agregados. De acordo com os resultados relatados este sistema mostra-se promissor para ser utilizado na liberação de cloridrato de propranolol.

# ***CAPÍTULO 4***

## ***Resultados e Discussão***

---

*Sistemas de liberação de cloridrato de propranolol em  
matrizes poliméricas*

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a síntese e caracterização físico-química de polímeros sintetizados a base de  $\beta$ -ciclodextrina (poli $\beta$ CD). Para tanto foram utilizadas técnicas de ressonância magnética nuclear, espalhamento de luz estático, difração de raios-X, análise térmica, bem como determinação da viabilidade celular pelo método de metabolização do MTT. A poli $\beta$ CD foi utilizada juntamente com o poli(ácido metacrílico) na preparação de fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais contendo cloridrato de propranolol, as quais foram obtidas por eletrofiação. A obtenção destes dois arranjos de fibras tem por objetivo avaliar qual sistema possui maior capacidade de controlar a liberação do fármaco, diminuindo o efeito de explosão, uma vez que o controle da pressão arterial crônica requer estas condições.

Todas as fibras foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho por reflectância total atenuada, análise térmica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e ângulo de contato da água. Posteriormente, foi investigada a cinética de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol a partir das fibras poliméricas obtidas.

##### **4.1 Síntese de polímeros a base de $\beta$ -ciclodextrina**

A estratégia de síntese empregada para a obtenção de poli $\beta$ CD através da reação de policondensação em meio fortemente alcalino utilizando epicloridrina (EP) como agente de acoplamento foi eficiente e apresentou um rendimento aproximado de 41 %, semelhante a resultados previamente descritos [50]. O procedimento de síntese foi realizado por cinco vezes e foi constatada sua reprodutibilidade, a qual está intimamente relacionada ao controle das condições experimentais. Estudos anteriores mostram que o tempo de reação, a concentração da solução de NaOH, a razão molar de EP/ $\beta$ CD, a temperatura e agitação do meio são importantes fatores que modificam as características do polímero obtido. Assim, a manutenção das condições descritas no Capítulo 2 item 2.2.5 resultou na reprodutibilidade do processo [50, 51, 117]. A Figura 4.1 apresenta a representação esquemática da formação da poli $\beta$ CD e a Figura 4.2 o mecanismo proposto para a reação [118].

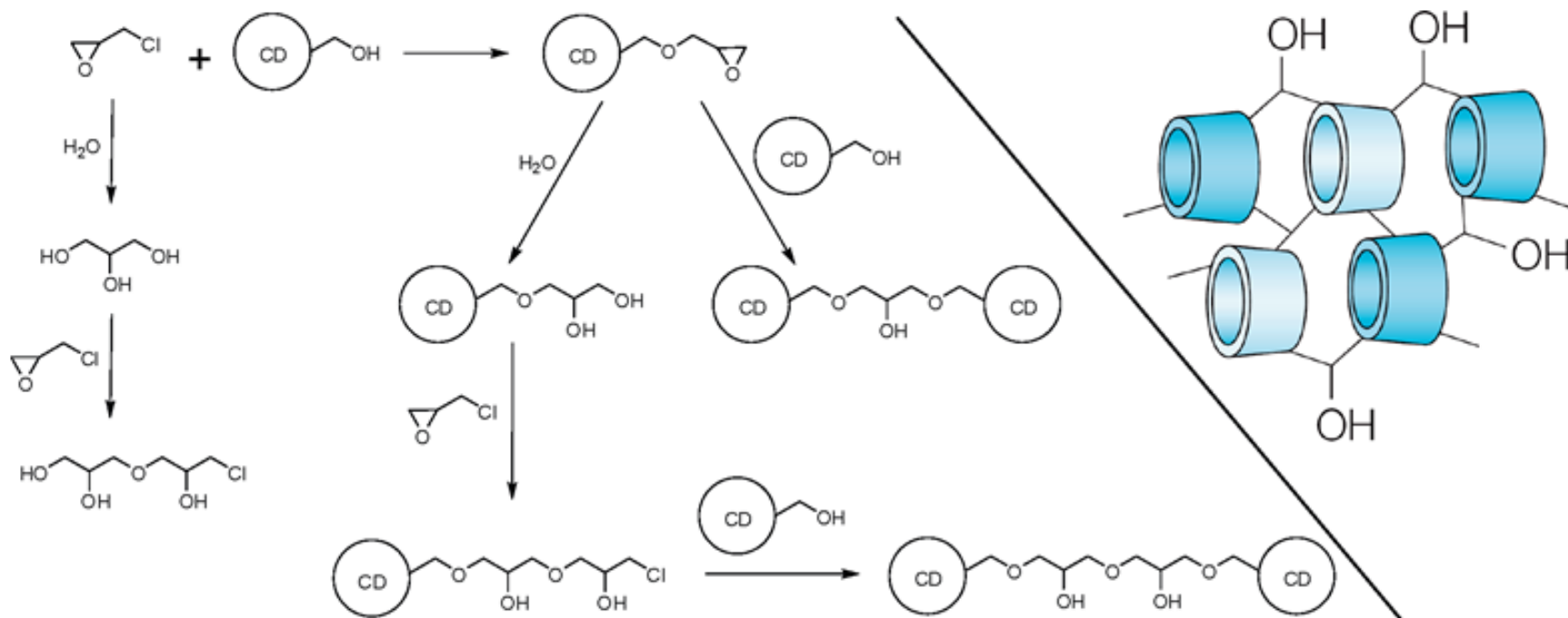


Figura 4.1 - Representação esquemática de formação da poliβCD por policondesação utilizando epicloridrina como agente de acoplamento [119].

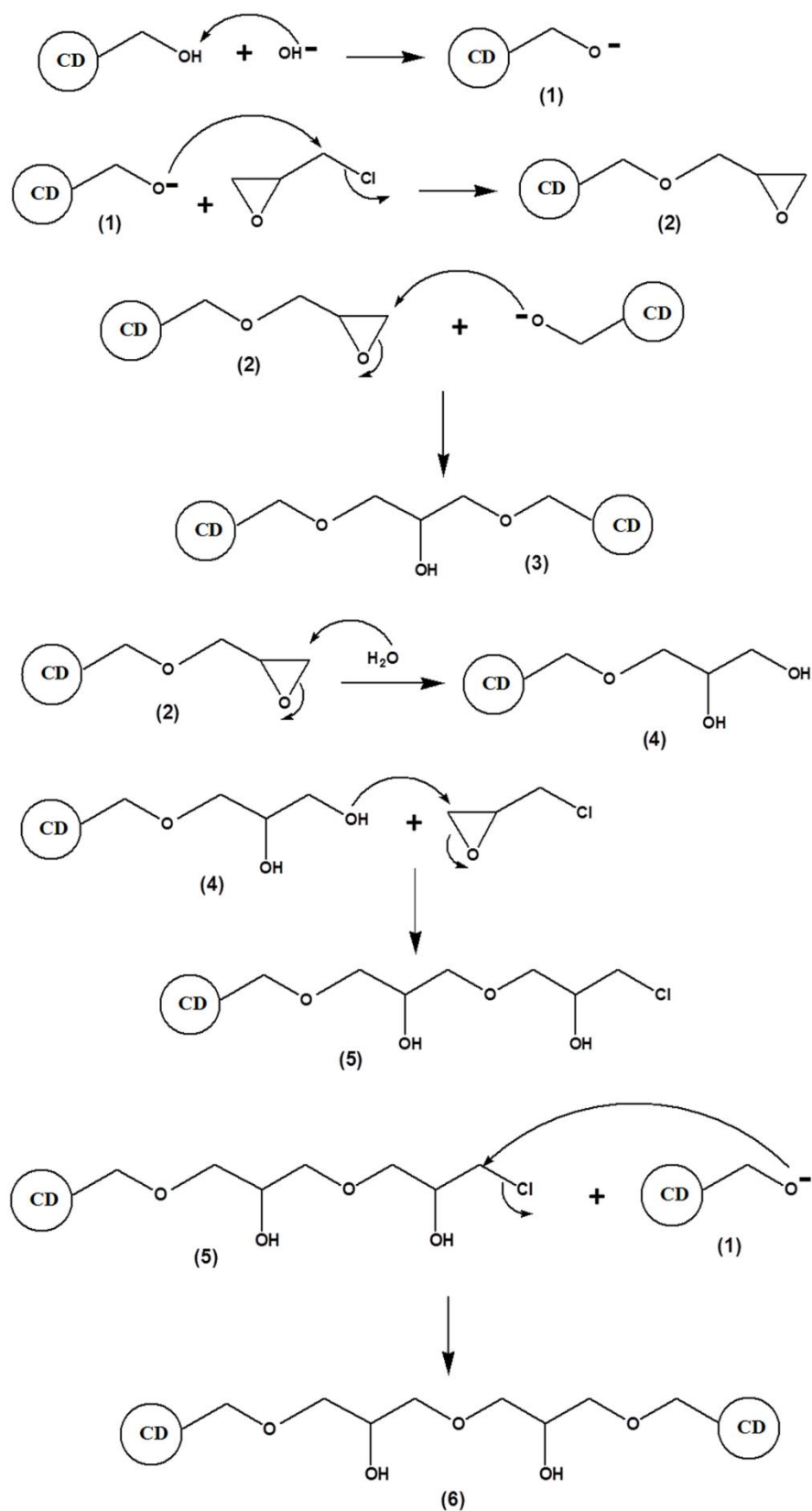


Figura 4.2 - Mecanismo geral proposto para a obtenção de poli $\beta$ CD a partir de  $\beta$ CD e epicloridrina em meio fortemente alcalino [50].

#### 4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

A Figura 4.3 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a poli $\beta$ CD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) e para efeitos de comparação também é apresentado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a  $\beta$ CD na forma monomérica. Conforme mencionado anteriormente, os hidrogênios referentes às hidroxilas não são visualizados devido à troca espontânea por átomos de deutério do solvente.

Pode-se observar que o espectro de hidrogênio para a poli $\beta$ CD apresenta alargamento dos picos quando comparado ao da  $\beta$ CD. Tal comportamento é característico de macromoléculas e se deve a grande sobreposição de sinais oriundos dos monômeros. Dessa forma, a ressonância magnética foi utilizada como uma ferramenta para confirmar a polimerização. A porcentagem de  $\beta$ CD presente no polímero pode ser determinada considerando-se que no espectro estão presentes dois tipos de sinais: o **H1** em aproximadamente 5,2 *ppm* e dois outros picos entre 3 e 4 *ppm* referentes aos prótons **H2,H3,H4,H5** e **H6** da ciclodextrina sobrepostos aos prótons **Ha,Hb** e **Hc** da epicloridrina (do grupo 2-hidroxipropil éter, que é o fragmento resultante da reação de policondensação). Consequentemente, o aumento de cinco átomos de hidrogênio oriundos de uma molécula de epicloridrina pode ser observado no valor da integral desses picos. A razão das integrais dos picos entre 3 e 4 *ppm* antes da polimerização (valor das integrais = 6,00) e após a polimerização (valor das integrais = 12,45) permite determinar o grau de substituição [50, 51]. Assim, o polímero sintetizado possui 50 % em peso de  $\beta$ CD, valor que é semelhante aos descritos na literatura [51].

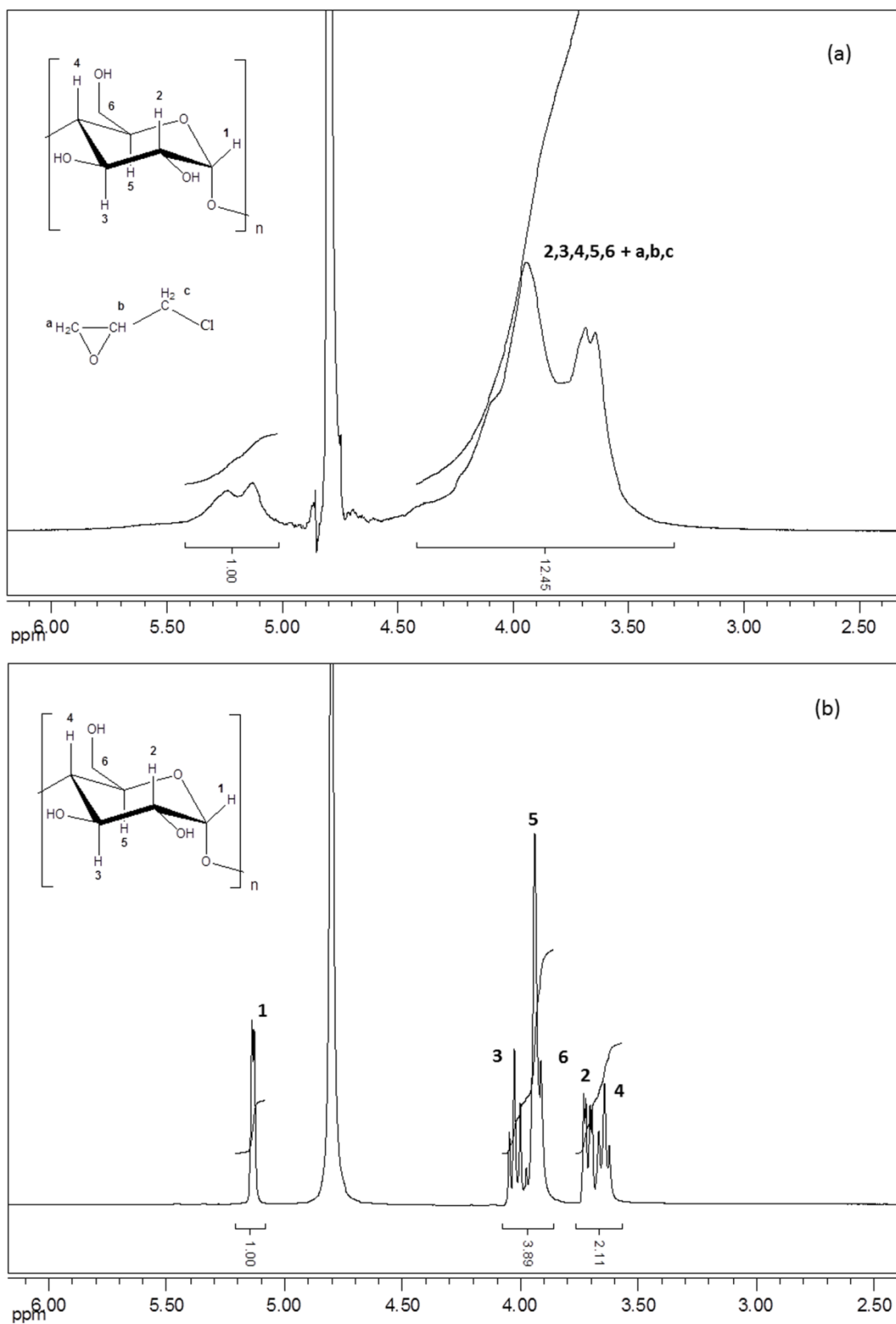


Figura 4.3 - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) para: (a) poliβCD e (b) βCD.

#### 4.1.2 Espalhamento de Luz Estático

A técnica de espalhamento de luz estático foi utilizada como um método direto para determinação da massa molar ponderal média da poliβCD sintetizada, bem como do raio de giro e do segundo coeficiente do virial. Estes parâmetros foram obtidos medindo-se a intensidade da luz espalhada por diferentes concentrações da solução polimérica a diferentes ângulos. A Equação 4.1 apresenta a equação de Debye que relaciona a massa molar ponderal média ( $M_w$ ) com o segundo coeficiente do virial ( $A_2$ ) [118].

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2A_2C \quad \text{Eq. 4.1}$$

na qual  $C$  é a concentração,  $K$  é a constante óptica e  $R_\theta$  a razão de Rayleigh, onde essas duas últimas são definidas pelas Equações 4.2 e 4.3, respectivamente:

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \text{Eq. 4.2}$$

na qual  $N_A$  é o número de Avogadro,  $\lambda_0$  o comprimento de onda do laser,  $n_0$  o índice de refração do solvente e  $dn/dc$  é o incremento do índice de refração em função da concentração do soluto.

$$R_\theta = \frac{r^2 i_\theta}{I_0(1+\cos^2\theta)} \quad \text{Eq. 4.3}$$

na qual  $r$  é a distância do detector até amostra;  $i_\theta$  é a intensidade espalhada em diferentes ângulos;  $I_0$  é a intensidade incidente e  $\theta$  é o ângulo de espalhamento.

Considerando a inserção do fator de forma das partículas  $P(\theta)$ , a Equação 4.1 pode ser reescrita, gerando a Equação 4.4

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2C \quad \text{Eq. 4.4}$$

na qual  $P(\theta)$  pode ser definido em termos do raio de giro ( $R_g$ ), conforme apresentado na Equação 4.5.

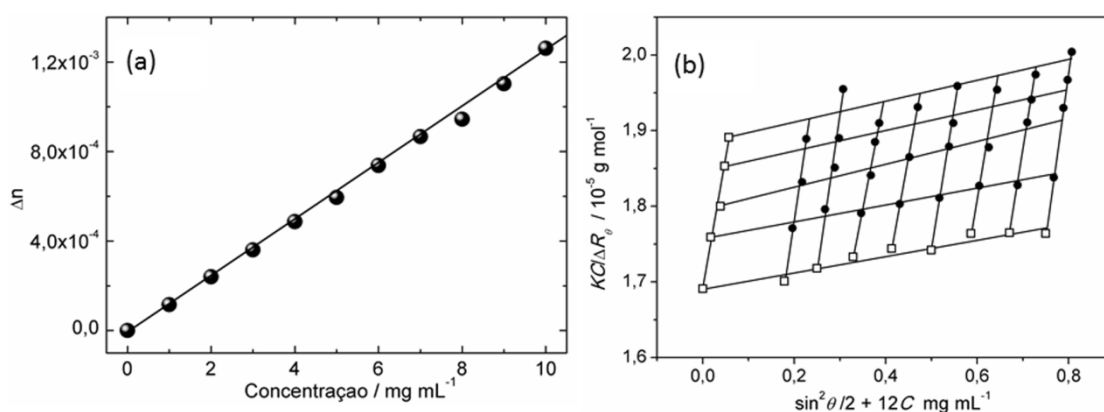
$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \text{sen}^2 \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad \text{Eq. 4.5}$$

Substituindo-se a Equação 4.5 na Equação 4.4, obtém-se a Equação de Zimm definida na Equação 4.6

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left[ 1 + \frac{16\pi^2 R_g^2 \text{sen}^2\left(\frac{\theta}{2}\right)}{3\lambda^4} \right] \frac{1}{M} + 2A_2C \quad \text{Eq. 4.6}$$

Dessa forma, pode-se construir o gráfico de  $KC/R_\theta$  em função de  $\text{sen}^2(\theta/2) + kC$ , onde  $k$  é uma constante para garantir a separação gráfica das curvas de espalhamento obtidas a diferentes concentrações. Extrapolando-se os dados para  $C = 0$  e  $\theta = 0$ , o inverso da massa molar média é obtido pela intersecção com o eixo das ordenadas. Das inclinações das retas obtidas para  $C = 0$  e  $\theta = 0$  são obtidos, respectivamente, o raio de giro e o segundo coeficiente virial [117, 118].

Sendo assim, para a determinação dos parâmetros acima citados, torna-se necessária a obtenção do valor numérico de  $dn/dC$  que corresponde ao incremento do índice de refração em função da concentração de poliβCD. Para tanto foi utilizado um refratômetro diferencial capaz de medir a diferença de índice de refração entre uma solução e o solvente como uma função da concentração de soluto, sendo que o valor obtido  $dn/dC$  corresponde à inclinação da curva obtida, Figura 4.4(a). Para a poliβCD sintetizada o valor de  $dn/dC$  obtido foi de  $1,2392 \times 10^{-4}$  (mL mg<sup>-1</sup>). Utilizando este valor de  $dn/dC$ , pôde-se construir o gráfico de Zimm que é apresentado na Figura 4.4(b).



**Figura 4.4 - (a) Diferença de índice de refração em função da concentração de poliβCD e (b) gráfico de Zimm para poliβCD com concentrações variando entre 0,4 a 5 g mL<sup>-1</sup> e faixa angular de 30 a 110°.**

A Tabela 4.1 apresenta os valores de massa molar ponderal média ( $M_w$ ), segundo coeficiente do viral ( $A_2$ ) e raio de giro ( $R_g$ ) para a poli $\beta$ CD.

**Tabela 4.1 - Valores de massa molar ponderal média ( $M_w$ ), segundo coeficiente do viral ( $A_2$ ) e raio de giro ( $R_g$ ) para a poli $\beta$ CD obtidos por espalhamento de luz estático.**

<b>POLÍMERO</b>	<b><math>M_w</math> (<math>g\ mol^{-1}</math>)</b>	<b><math>A_2</math> (<math>cm^3\ mol\ g^{-2}</math>)</b>	<b><math>R_g</math> (<math>nm</math>)</b>
poli $\beta$ CD	$(6,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$20 \pm 3$

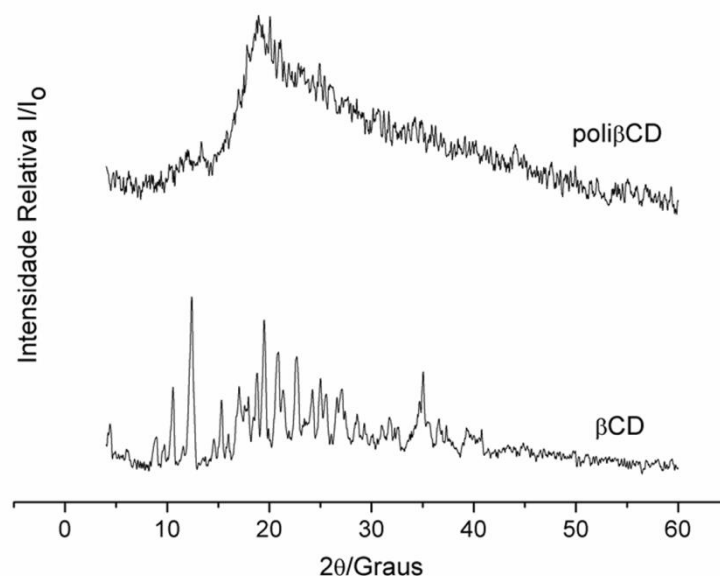
Como mencionado anteriormente, estudos relatam que a massa molar média de poli-ciclodextrinas depende das condições experimentais empregadas. Dessa forma, a literatura apresenta uma grande variedade de valores de massas moleculares [50, 51, 120]. Uma vez que a massa molar do polímero está intimamente relacionada com suas propriedades, é de suma importância o controle das condições experimentais para desenvolver uma rota sintética reproduzível.

O coeficiente do virial é um parâmetro que avalia as forças atrativas e repulsivas existentes entre moléculas do soluto e do solvente, ou seja,  $A_2$  está relacionado com as interações polímero-polímero, bem como polímero-solvente. Valores positivos para  $A_2$  indicam interações favoráveis entre o polímero e o solvente, no caso em análise a água. Este resultado está de acordo com a solubilidade bem superior da poli $\beta$ CD em água (cerca de 40 g/100 mL) quando comparada com a  $\beta$ CD monomérica (1,85 g/100 mL) [57].

O raio de giro descreve a distribuição estatística das distâncias entre os extremos de uma partícula e o centro de massa [118]. Ou seja, para um polímero este parâmetro denota a média das distâncias de cada um dos segmentos da cadeia ao seu centro de massa. Sendo assim, o valor de 20 nm é um indicativo da dimensão da cadeia polimérica.

#### **4.1.3 Difração de raios-X**

O perfil cristalográfico dos materiais utilizados como matriz em sistemas de liberação de fármacos é um dos fatores que tem grande influência na modulação de liberação das moléculas, pois estão relacionados com a solubilidade do material. Assim, materiais amorfos são considerados, geralmente, mais hidrofílicos quando comparados aos sólidos cristalinos e por essa razão sua análise é de grande importância [69]. A Figura 4.5 apresenta os difratogramas de raios-X de pó para a poli $\beta$ CD e para a  $\beta$ CD.



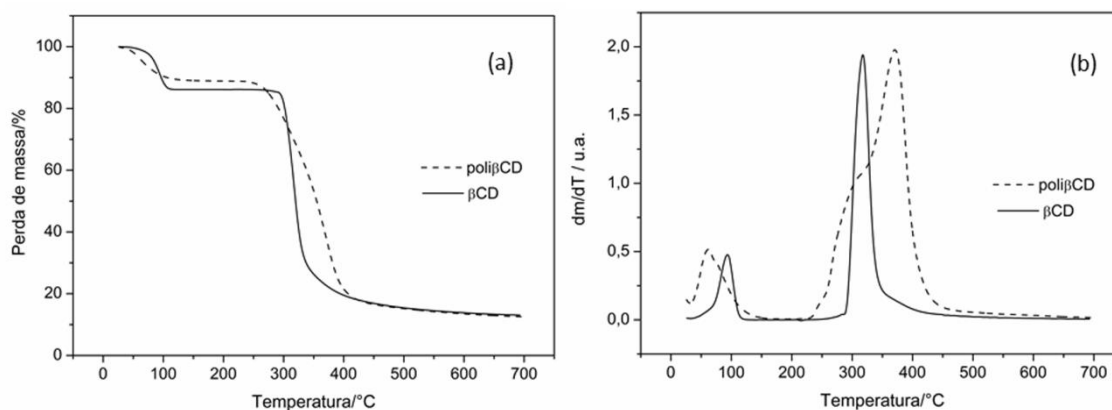
**Figura 4.5 - Difratoogramas de raios-X de pó para poliβCD e βCD obtidos em tubo de cobre utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,54051$ .**

Analisando os perfis de difração de raios-X, verifica-se que a poliβCD exibe um padrão cristalográfico amorfo, com halo de amorficidade entre 15 a 40  $2\theta$ , enquanto que a βCD mostra-se policristalina, com as linhas características mais intensas entre 10 a 30  $2\theta$ . Tal fato está de acordo com a maior solubilidade relatada para a poliβCD em comparação com a βCD [28].

#### **4.1.4 Análise Térmica**

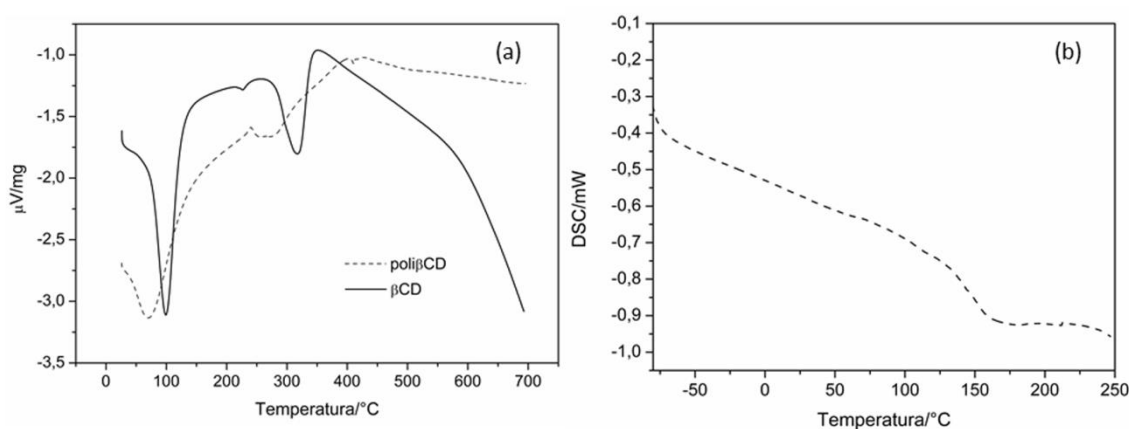
A Figura 4.6 apresenta as curvas TG e DTG para a poliβCD e βCD. Pode-se observar que as mesmas apresentam perfil de decomposição térmica semelhante, embora a βCD apresente eventos de perdas de massa mais bem definidos quando comparados à poliβCD. Para a βCD verifica-se um primeiro evento de perda de massa de 15 % que se finaliza em aproximadamente 100 °C e é referente à perda de 10 moléculas de água presentes na estrutura da macromolécula (interior e exterior). O mesmo evento é observado para a poliβCD, porém a perda de água de hidratação é de apenas 10 %. O segundo evento térmico está associado à decomposição de ambas as moléculas. Analisando-se a curva DTG para a βCD observa-se que a decomposição se estende de 300 a 400 °C e se refere a um único evento térmico. Já para a poliβCD a curva DTG indica que a decomposição ocorre em mais de um evento e se estende de 250 a 400 °C, assim o polímero possui menor estabilidade térmica

quando comparado ao monômero que lhe deu origem. Tal fato pode estar associado à perda da estrutura cristalina exibida pela poliβCD, a qual possui perfil cristalográfico amorfo, conforme apresentado e discutido no item 4.1.3. Além disso, pode-se dizer que o percentual de resíduo final é o mesmo para βCD e poliβCD, o qual corresponde a cerca de 10 % e pode ser atribuído à formação de carbono amorfo, conforme reportado para a βCD na literatura [121].



**Figura 4.6 - (a) Curvas TG para a poliβCD e para a βCD em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e (b) curvas DTG para a poliβCD e para a βCD.**

A Figura 4.7 apresenta as curvas DTA para a poliβCD e βCD e a curva DSC para a poliβCD. Os dois eventos endotérmicos observados em ambas as curvas DTA estão associados à perda de massa, uma vez que ocorrem nas mesmas temperaturas de termodecomposição das referidas substâncias, conforme demonstrado pelas curvas TG/DTG. Com o intuito de avaliar a temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) da poliβCD, a qual não foi observada na curva DTA, também foi obtida a curva DSC. É observado um evento de mudança na linha de base em torno de 125 °C que pode ser atribuído à T<sub>g</sub> do polímero.

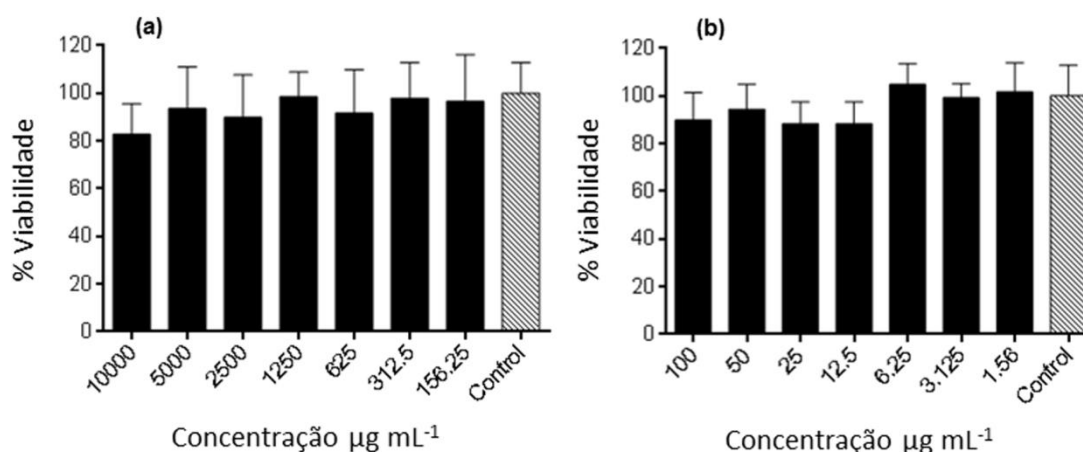


**Figura 4.7 - (a) Curvas DTA para a poliβCD e βCD e (b) curva DSC para a poliβCD em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>.**

#### 4.1.5 Determinação da Viabilidade Celular

O potencial citotóxico da poliβCD sintetizada foi avaliado por ensaios de viabilidade celular utilizando o método de metabolização do brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-(difeniltetrazol), MTT, o qual é um modelo simples e eficaz para detectar células vivas e em crescimento. O princípio do método se baseia na capacidade das enzimas *desidrogenases* localizadas nas mitocôndrias de células viáveis converterem o reagente MTT de coloração amarela e solúvel em água em um produto de coloração azul escuro e insolúvel denominado formazan. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis [122].

A Figura 4.8 apresenta as porcentagens de viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos incubados por 48 horas, os quais foram expostos a diferentes concentrações de polímero que variavam de 10000 a 1,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 4.8 - Porcentagem de viabilidade de fibroblastos tratados com soluções de poliβCD com concentrações de 10.000 a 1,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  por 48 horas.**

Analisando os resultados obtidos, pode-se dizer que não foram observados efeitos citotóxicos para o polímero nas concentrações estudadas, uma vez que a viabilidade celular está próxima de 100 % para todos os sistemas. Sendo assim, foi constatado que o tempo de exposição de 48 horas não ocasiona diferenças estatísticas significativas entre o controle positivo e os valores de viabilidade celular. Segundo Sjögren e colaboradores (2000), a citotoxicidade dos compostos pode ser classificada da seguinte forma em função da viabilidade celular:

**Tabela 4.2 - Citotoxicidade de compostos em função da porcentagem de viabilidade celular.**

<b>CITOTOXICIDADE</b>	<b>VIABILIDADE CELULAR</b>
Não citotóxico	Maior que 90 %
Ligeiramente citotóxico	Entre 60 - 90 %
Moderadamente citotóxico	Entre 30 - 59 %
Severamente citotóxico	Menor ou igual a 30 %

Tendo em vista os resultados apresentados, a poli $\beta$ CD é um polímero biocompatível, sendo uma matriz promissora para ser utilizada na preparação de fibras poliméricas destinadas à liberação de fármacos, neste caso específico o cloridrato de propranolol.

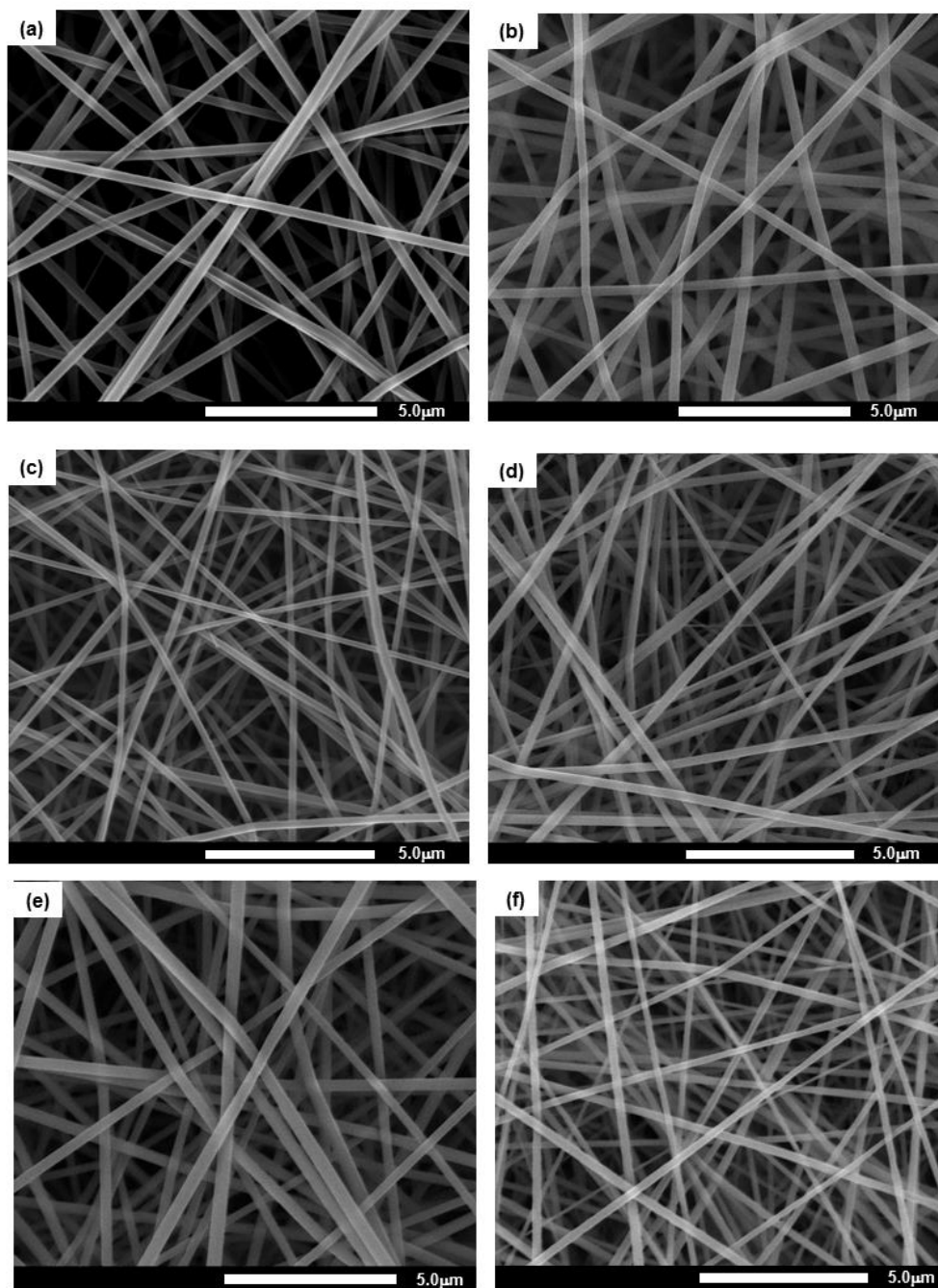
#### **4.2 Preparação de fibras poliméricas contendo cloridrato de propranolol por eletrofição**

A poli $\beta$ CD sintetizada foi utilizada juntamente com o polímero comercial poli(ácido metacrílico), (PMAA) para produzir fibras poliméricas na ausência e presença do cloridrato de propranolol. Duas estratégias foram empregadas para produção das referidas fibras, a primeira envolveu o preparo de blendas poliméricas e posterior produção de fibras uniaxiais, as quais foram obtidas através da aplicação de um campo elétrico entre o bico injetor de saída única e um substrato coletor, conforme apresenta a Figura 1.10. Na segunda foram utilizadas soluções poliméricas individualizadas que foram bombeadas até um bico injetor de saída múltipla, no qual um capilar menor passa por dentro de um capilar maior e as duas soluções se combinam somente na saída do bico injetor. Através da aplicação do campo elétrico são produzidas fibras coaxiais, nas quais a região interna é formada por poli $\beta$ CD e esta é revestida externamente por PMAA, conforme ilustra a Figura 1.11.

##### **4.2.1 Preparação e caracterização de fibras poliméricas uniaxiais contendo cloridrato de propranolol**

Foram preparadas blendas poliméricas nas quais a concentração total de polímeros foi de 250 mg mL<sup>-1</sup> e as proporções foram de 100:0; 80:20 e 60:40 %(p/p) de PMAA:poli $\beta$ CD. Os mesmos sistemas também foram preparados com adição de cloridrato de propranolol na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>. A Figura 4.9 apresenta as micrografias para as fibras obtidas. Analisando-se as micrografias verifica-se que todas as fibras possuem orientação randômica, morfologia uniforme, não apresentando gotas e nem poros em sua estrutura. Assim, pode-se

dizer que o aumento da porcentagem de poli $\beta$ CD na blenda e a adição de cloridrato de propranolol não ocasionaram mudanças morfológicas nas fibras. O diâmetro médio das fibras e o respectivo desvio padrão são apresentados na Tabela 4.3, na qual pode ser observado que todas as fibras produzidas possuem diâmetro nanométrico que não se altera de forma significativa com o aumento da porcentagem de poli $\beta$ CD na blenda e com a adição de fármaco.

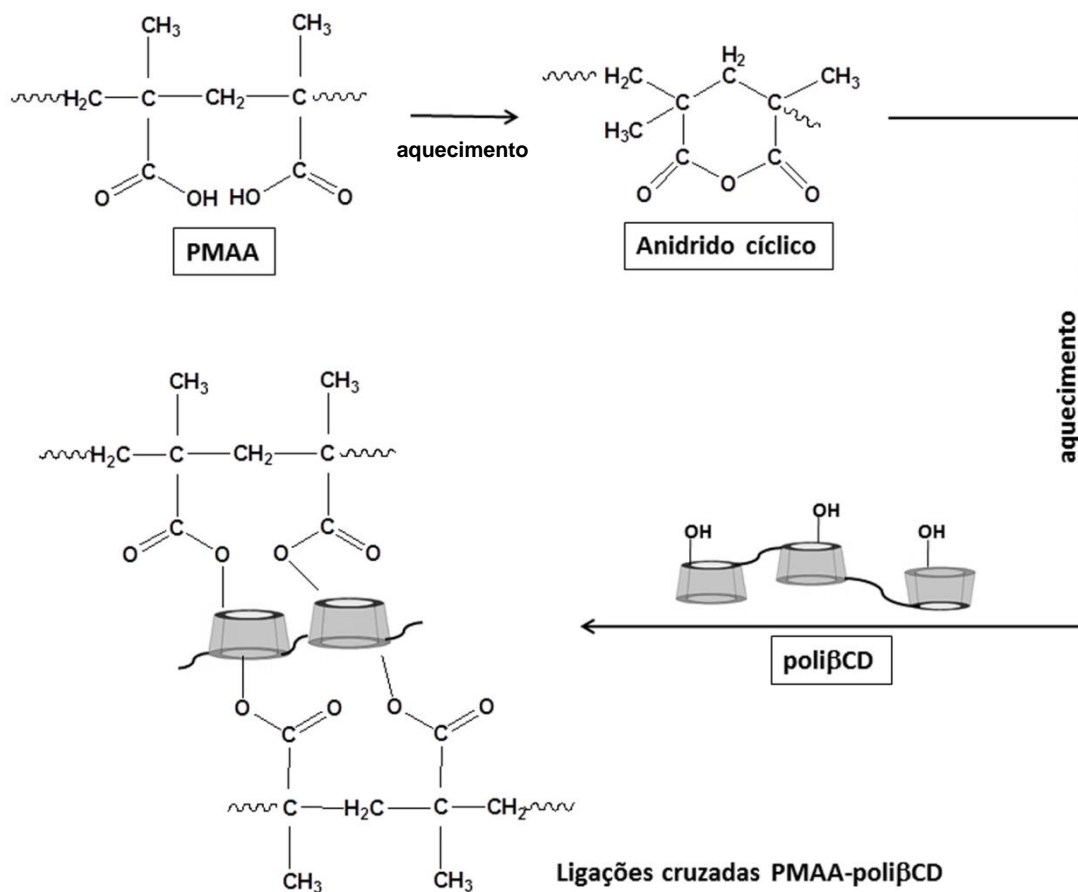


**Figura 4.9 - Micrografias de fibras uniaxiais obtidas por eletrofição com magnificação de 10000x: (a) PMAA; (b) PMAA + PROP; (c) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20); (d) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP; (e) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) e (f) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) + PROP.**

Tabela 4.3 - Diâmetro das fibras uniaxiais de PMAA e poliβCD preparadas por eletrofiação.

<b>FIBRA</b>	<b>DIÂMETRO (nm)</b>
PMAA	(290 ± 35)
PMAA + PROP	(310 ± 38)
PMAA:poliβCD (80:20)	(254 ± 45)
PMAA:poliβCD (80:20)+ PROP	(252 ± 37)
PMAA:poliβCD (60:40)	(305 ± 45)
PMAA:poliβCD (60:40)+ PROP	(250 ± 34)

Considerando que os polímeros utilizados no preparo das fibras possuem caráter hidrofílico, estes se dissolveriam prontamente em água e as fibras não atuariam como matrizes de liberação de fármacos, os quais seriam liberados de forma imediata no meio. Dessa forma, para que esses sistemas pudessem ser empregados para a destinação proposta, os mesmos foram submetidos a tratamento térmico com aquecimento de 170°C por 48 horas que teve como objetivo induzir a formação de ligações cruzadas entre as moléculas do PMAA e de poliβCD, diminuindo a solubilidade das fibras em água. Tal tratamento já havia sido descrito para o poli(ácido acrílico) utilizando βCD como agente reticulante. O mecanismo de reação consiste na obtenção de um anidrido cíclico que se forma mediante a desidratação de dois grupos ácidos carboxílicos vizinhos, conforme ilustra a Figura 4.10. Posteriormente, o anidrido formado reage com os grupos hidroxilas da βCD dando origem a ligações éster entre as cadeias dos polímeros [81].



**Figura 4.10 - Esquema para formação de ligações cruzadas induzidas entre o PMAA a poliβCD por aquecimento [81].**

A Figura 4.11 apresenta as micrografias obtidas para as fibras poliméricas após o tratamento térmico, nas quais não são visualizadas mudanças morfológicas e de diâmetro que sejam significativas decorrentes do aquecimento.

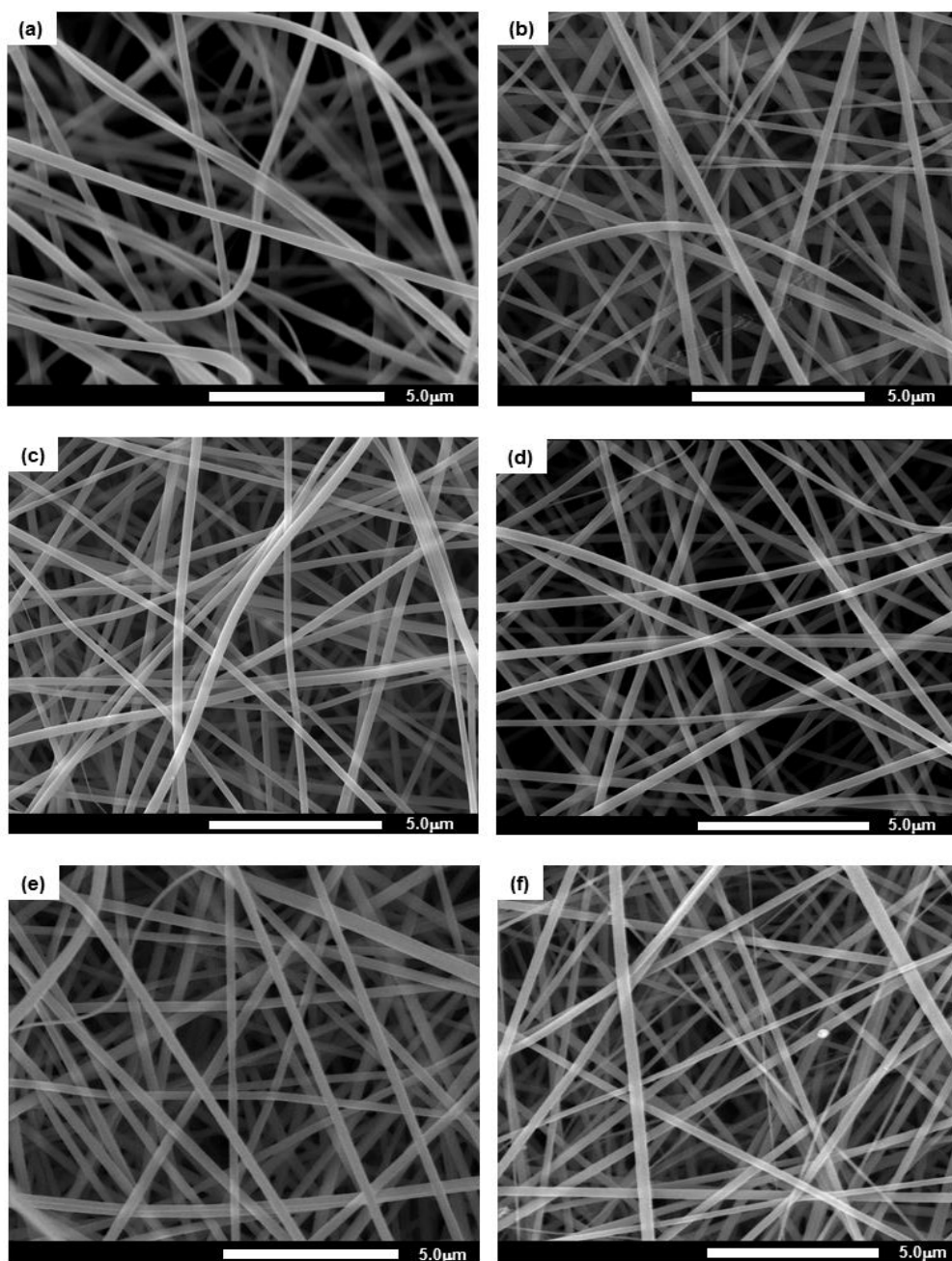


Figura 4.11 - Micrografias de fibras uniaxiais obtidas por eletrofiação com magnificação de 10000x após tratamento térmico: (a) PMAA; (b) PMAA + PROP; (c) blenda PMAA:poliβCD (80:20); (d) blenda PMAA:poliβCD (80:20)+ PROP; (e) blenda PMAA:poliβCD (60:40) (f) blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP.

A Figura 4.12 apresenta os espectros na região do infravermelho para o PMAA, poliβCD e cloridrato de propranolol. Analisando o espectro de infravermelho para o PMAA pode-se observar a presença dos seguintes modos vibracionais: em 1697 cm<sup>-1</sup> tem-se o estiramento C=O dos grupos ácidos; entre 2990-2890 cm<sup>-1</sup> têm-se os estiramentos simétrico e assimétrico C-H; e uma banda larga na região de 3400 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento O-H. Devido à formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, ácidos carboxílicos tendem a se organizar como dímeros, fato que ocasiona o aumento da intensidade da banda de O-H. Os modos vibracionais presentes em 1393, 1266, 960 e 930 cm<sup>-1</sup> estão associados aos dímeros formados [123].

O espectro de infravermelho para a poliβCD exibe os modos vibracionais característicos da βCD, sendo estes: 3360 cm<sup>-1</sup> banda larga de estiramento O-H, em 2921 cm<sup>-1</sup> estiramento C-H e 1025 cm<sup>-1</sup> o estiramento C-O-C referente à ligação glicosídica. Outras bandas menos intensas situadas entre 1500 a 1200 cm<sup>-1</sup> são associadas às deformações C-H [124]. São observadas bandas largas, fato que está de acordo com o perfil amorfo que este polímero exibe e com a possibilidade de extensão das ligações de hidrogênio.

Para a molécula de cloridrato de propranolol os principais modos vibracionais estão relacionados na Tabela 4.4, os quais estão de acordo com a literatura [125].

**Tabela 4.4 - Relação dos principais modos vibracionais da molécula de cloridrato de propranolol.**

<b>REGIÃO (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>ATRIBUIÇÃO TENTATIVA</b>
3320	v O-H
3275	v N-H
2965	v C-H
1578	δ N-H
1452	δ O-H
1266 e 1240	v C-N
1105	v C-OH
796	δ C-H no anel benzênico
770	δ C-H no anel benzênico

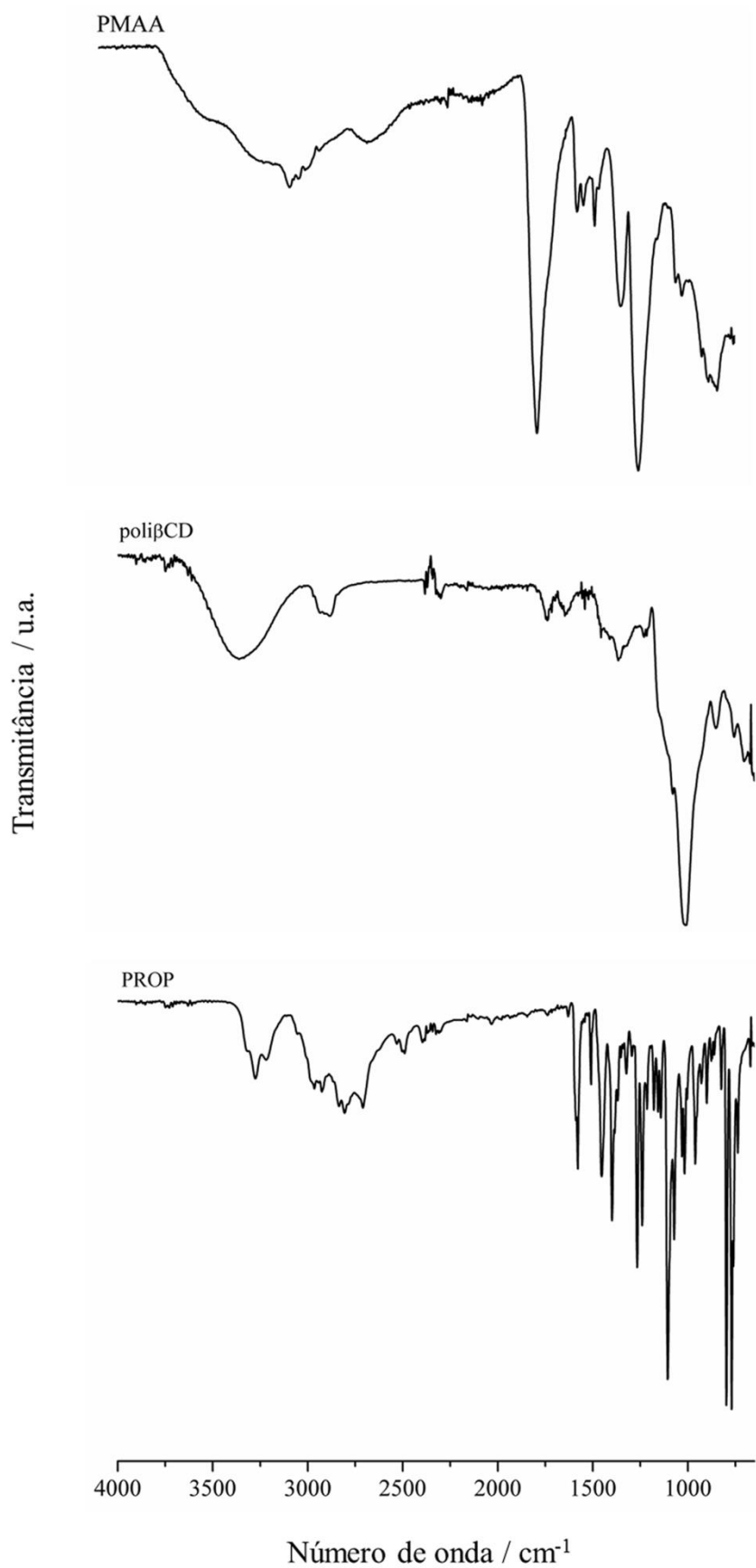


Figura 4.12 - Espectros de absorção na região do infravermelho para PMAA, poliβCD e PROP.

A Figura 4.13 apresenta os espectros na região do infravermelho para as fibras de PMAA antes e após o tratamento térmico. Estes dois espectros são similares na sua maior parte, mas apresentam diferenças importantes, com dois modos vibracionais novos em 1803 e 1021  $\text{cm}^{-1}$  na fibra que foi submetida ao aquecimento. Este fato pode estar associado à formação do anidrido cíclico que ocorre durante a desidratação dos grupos ácidos carboxílicos gerando as referidas bandas que correspondem ao estiramento C-O-C, conforme comprovado por estudos anteriores [81].

A Figura 4.13 também apresenta os espectros na região do infravermelho para as fibras de PMAA contendo PROP antes e após o tratamento térmico, nas quais não são observados os modos vibracionais do PROP provavelmente devido à menor concentração do mesmo e à consequente sobreposição de bandas mais intensas do PMAA. Comparando-se os espectros das fibras de PMAA contendo PROP ao das fibras sem adição do fármaco, ambas sem tratamento térmico, pode-se dizer que estes são semelhantes, exceto pelo pequeno desdobramento na banda de estiramento C=O observado após a adição do fármaco, sugerindo que o PROP pode estar interagindo neste sítio da molécula de PMAA. Após o aquecimento, a fibra de PMAA contendo PROP apresentou mudanças nos modos vibracionais quando esta é comparada à fibra que não foi aquecida. Primeiramente, a banda de estiramento O-H sofreu redução em sua intensidade, fato que indica que a presença do fármaco interfere na desidratação dos grupos ácidos do PMAA. Outro aspecto que corrobora a informação anterior é a supressão da banda em 1266  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que esta está associada a modos vibracionais do dímero ácido. Verificou-se também o surgimento dos modos vibracionais em 1803 e 1021  $\text{cm}^{-1}$  associados à formação do anidrido cíclico. Interações entre fármacos e polímeros acrílicos têm sido descritas na literatura e a natureza destas pode variar de acordo com as características do polímero e do fármaco [126, 127]. De acordo com Perez-Marcos e colaboradores (1996) e Blanco-Fuente e colaboradores (2002), o cloridrato de propranolol interage eletrostaticamente com o Carbopol® (polímero que contém subunidades de poli(ácido acrílico), promovendo a ionização parcial dos grupos ácidos do polímero [128, 129]. Uma interação semelhante pode estar ocorrendo no sistema em estudo e justifica as mudanças observadas nos modos vibracionais dos espectros de infravermelho.

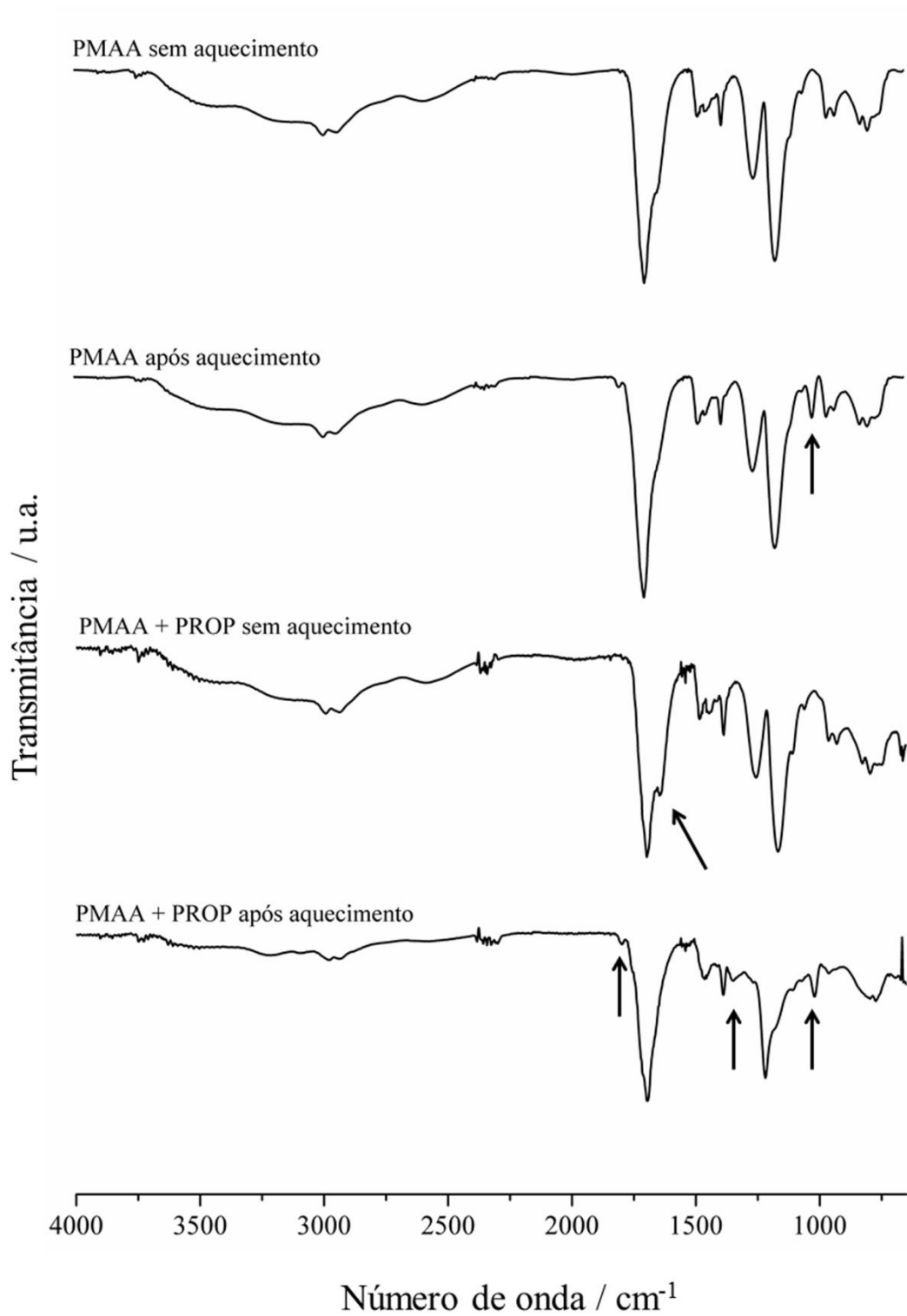


Figura 4.13 - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras PMAA antes e após tratamento térmico, fibras PMAA + PROP antes e após tratamento térmico.

A Figura 4.14 apresenta os espectros na região do infravermelho para as fibras da blenda PMAA:poliβCD (80:20) antes e após o tratamento térmico. Observa-se que ambos os espectros representam a soma dos modos vibracionais dos polímeros que constituem a blenda. Assim, a adição de poliβCD promove o aumento de intensidade da banda de estiramento O-H (na região de  $3300\text{ cm}^{-1}$ ), uma vez que para este polímero o modo vibracional em questão é bem mais intenso quando comparado ao PMAA. Verifica-se ainda a presença do modo vibracional em  $1070\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O-C da poliβCD. Além disso, é importante mencionar que o aquecimento das fibras não ocasionou mudanças que pudessem ser detectadas pela técnica utilizada. A Figura 4.14 também apresenta os espectros de infravermelho para as fibras contendo PROP antes e após o tratamento térmico, nas quais também não são observados os modos vibracionais do PROP. As mudanças nos modos vibracionais são as mesmas já descritas para as fibras de PMAA contendo PROP, indicando que para esta composição de blenda o fármaco também pode estar interagindo com os grupos ácidos do PMAA.

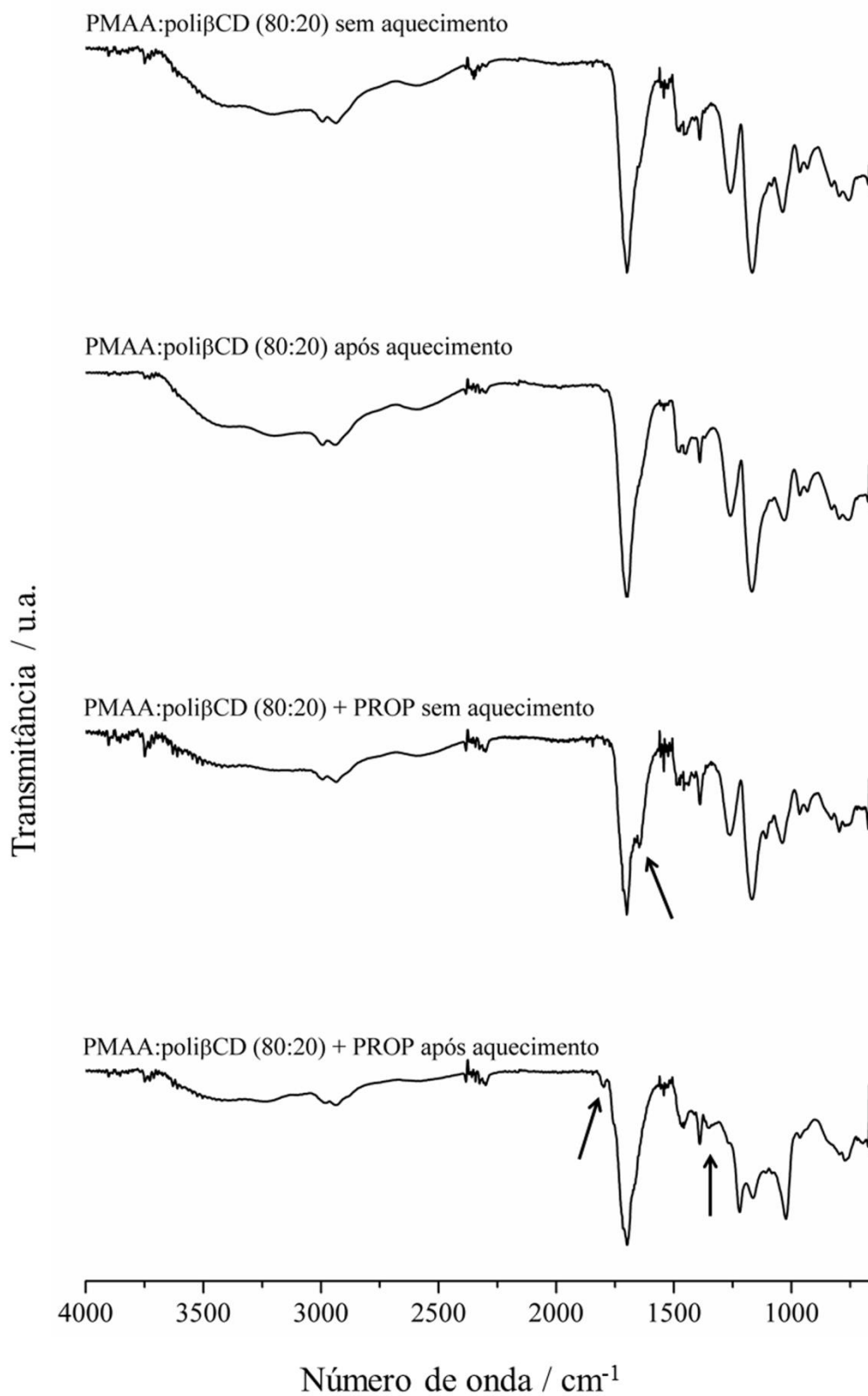


Figura 4.14 - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras da blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) antes e após tratamento térmico; fibras da blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP antes e após tratamento térmico.

A Figura 4.15 apresenta os espectros na região do infravermelho para as fibras blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) antes e após o tratamento térmico. Observa-se que os espectros também representam a soma dos modos vibracionais dos polímeros que constituem a blenda. Ambos apresentam o aumento de intensidade da banda de estiramento O-H, e para estas fibras em particular verifica-se o aumento da intensidade do modo vibracional em  $1070\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O-C da poli $\beta$ CD quando comparadas às fibras da blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20). A Figura 4.15 também apresenta os espectros de infravermelho para as fibras contendo PROP antes e após o tratamento térmico, nas quais não são observados os modos vibracionais do PROP. As mudanças nos modos vibracionais são semelhantes às descritas para as fibras de PMAA contendo PROP, exceto pela presença da banda em  $1266\text{ cm}^{-1}$ , que havia sido suprimida nas fibras de PMAA e da blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20), ambas contendo PROP e após o tratamento térmico. Este resultado indica que para esta composição de blenda o fármaco pode estar interagindo também com a poli $\beta$ CD que está presente em maior concentração. A fibra submetida ao tratamento térmico apresenta redução na intensidade do modo vibracional de estiramento O-H. Segundo Blanco-Fuente e colaboradores (2002), a adição de  $\beta$ CD à formulação contendo Carbopol® e cloridrato de propranolol ocasiona a diminuição das interações polímero/fármaco, que se explica pela formação de interação hóspede-hospedeiro entre o PROP e a  $\beta$ CD, fato que justifica o resultado apresentado [128].

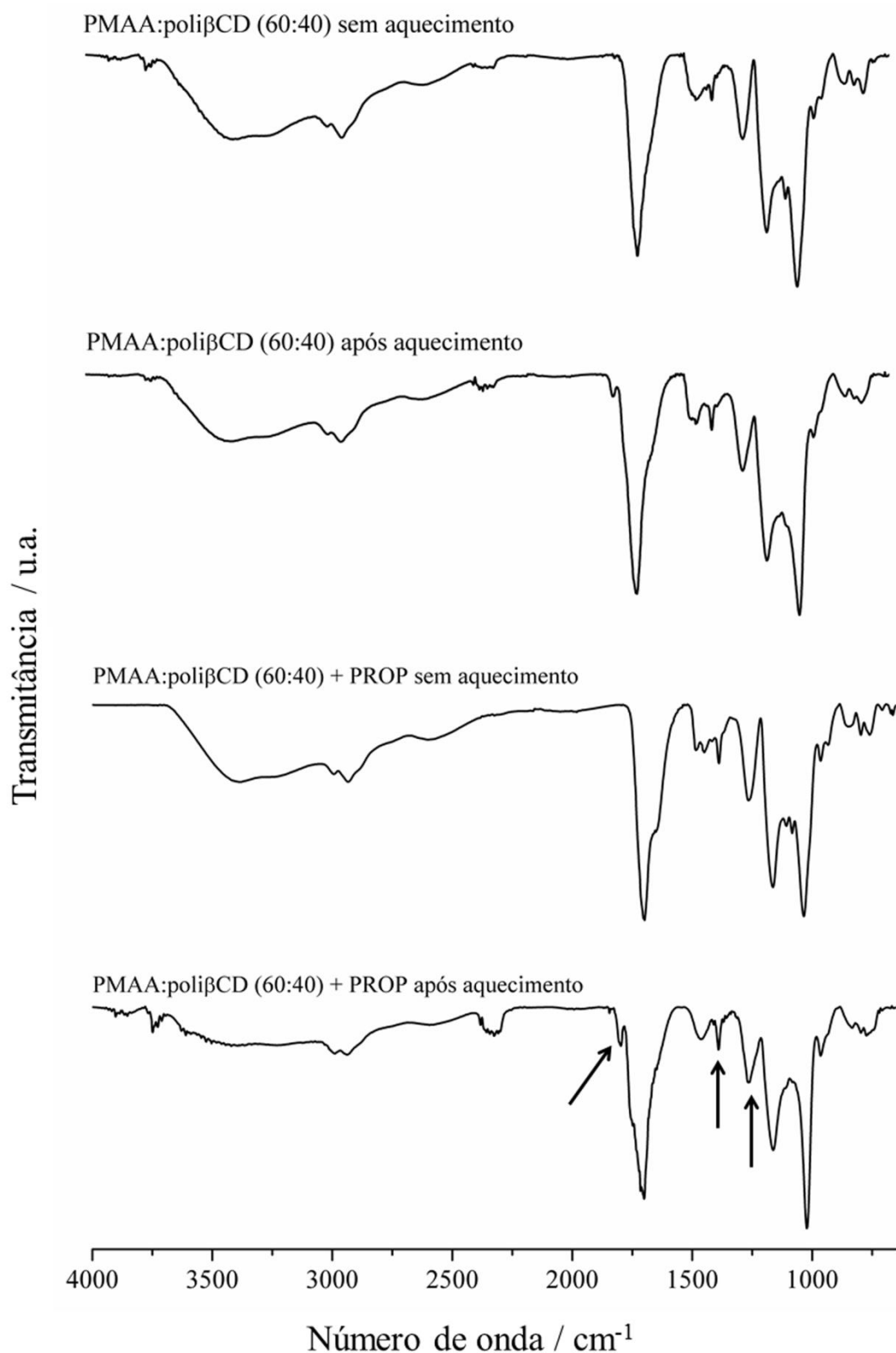
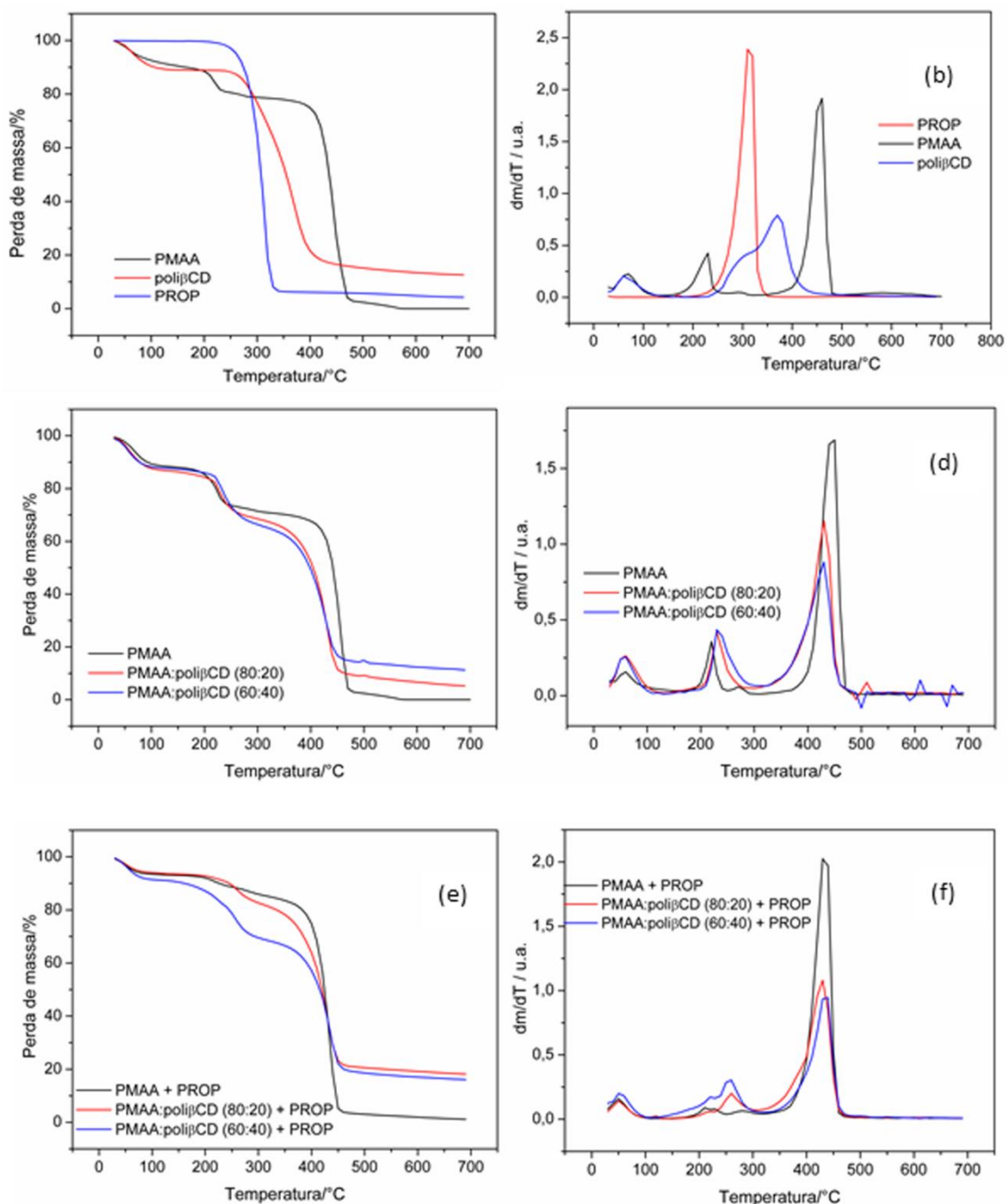


Figura 4.15 - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras da blenda PMAA:poliβCD (60:40) antes e após tratamento térmico; fibras da blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP antes e após tratamento térmico.

A Figura 4.16 apresenta as curvas TG e DTG para os materiais de partida e para fibras uniaxiais obtidas antes do aquecimento.



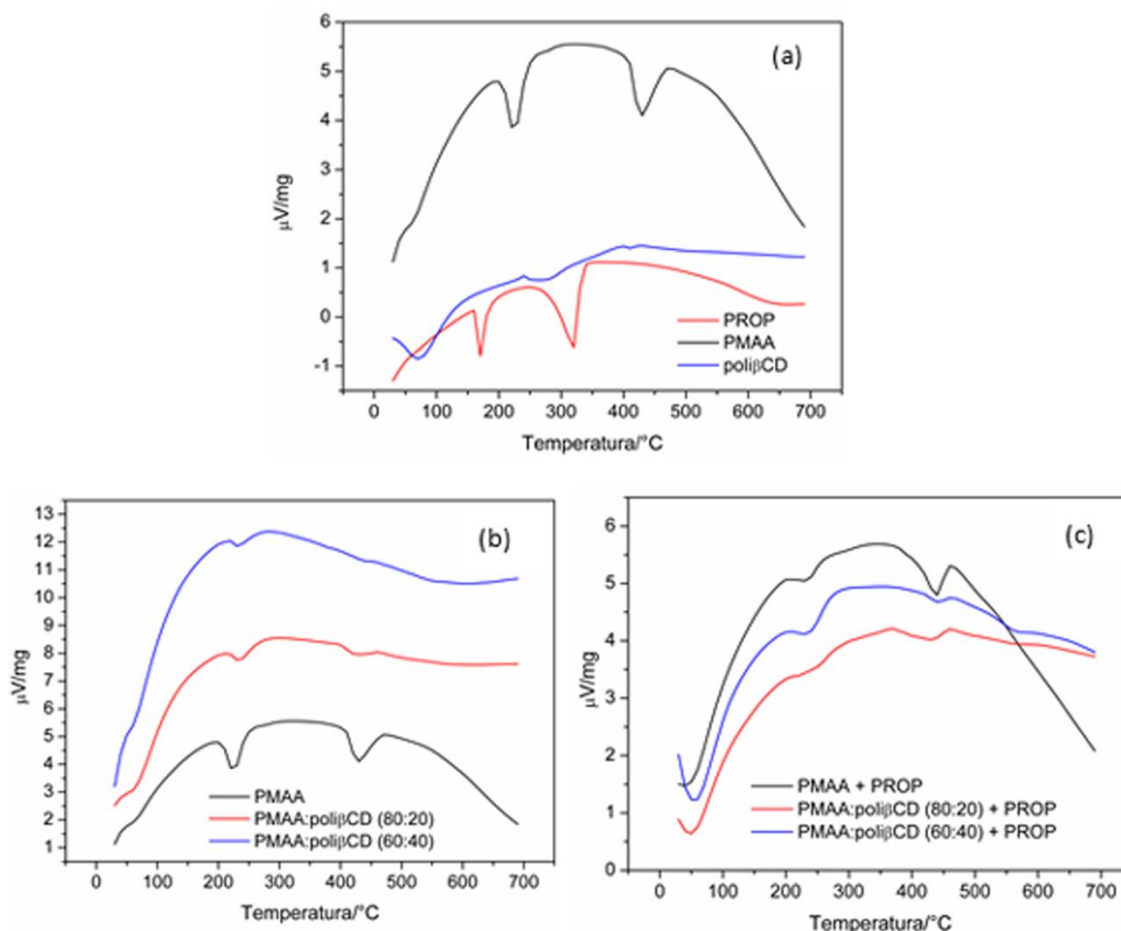
**Figura 4.16 - Curvas TG e DTG em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>: (a) e (b) PROP, PMAA e poliβCD; (c) e (d) fibras uniaxiais sem adição de PROP; (e) e (f) fibras uniaxiais com adição de PROP.**

A curva TG para o PROP apresenta um perfil de estabilidade até 250 °C e é seguida por uma única perda de massa de 95 %. Considerando que o PROP é uma molécula orgânica, a estabilidade térmica exibida por este fármaco pode sugerir a formação de interações moleculares no estado sólido mediante a formação de ligações de hidrogênio

intermoleculares, que necessitam de maior energia para serem rompidas. O PMAA possui três eventos de perda de massa sendo que o primeiro ocorre até 100 °C e corresponde à saída de água de hidratação. O segundo ocorre de 170 a 250 °C e está associado à desidratação que ocorre entre grupos carboxílicos vizinhos e o terceiro evento ocorre em 450 °C e corresponde a total decomposição do polímero [123]. A curva TG para a poliβCD é apresentada novamente para fins de comparação e sua análise foi apresentada no item 4.1.4.

Analisando as curvas TG e DTG para as fibras que não contém PROP, Figuras 4.16(c) e (d), pode-se observar que as mesmas apresentam um perfil de decomposição térmica semelhante ao PMAA e que a maior presença de resíduo final está associada ao aumento de poliβCD na composição das mesmas. Com relação às curvas TG e DTG para as fibras que contém PROP, Figuras 4.16(e) e (f), observa-se que a adição do fármaco promove uma mudança no perfil de decomposição, que pode ser principalmente visualizado para as fibras PMAA + PROP e blenda PMAA:poliβCD (80:20) + PROP. Nestas curvas, verifica-se que o segundo evento térmico que ocorre de 170 a 250 °C e corresponde à desidratação de grupos ácidos vizinhos do PMAA diminuiu, sugerindo que o PROP interage com esse polímero e auxilia o aumento da estabilidade térmica, corroborando os dados obtidos por infravermelho. Para as fibras da blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP verifica-se que não há supressão do evento que ocorre de 170 a 250 °C, fato que sugere que o fármaco pode interagir também com a poliβCD, presente em maior concentração nesta blenda, uma vez que a βCD da cadeia polimérica pode interagir com o fármaco, conforme demonstrado pelos experimentos de ressonância magnética nuclear apresentados no Capítulo 3, item 3.1. Assim, devido a esta interação, o PROP não interfere de forma considerável na desidratação do PMAA. Estes resultados também estão de acordo com os dados obtidos por infravermelho.

A Figura 4.17 apresenta as curvas DTA para os materiais de partida e para fibras uniaxiais obtidas.



**Figura 4.17 - Curvas DTA em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>: (a) PROP, PMAA e poliβCD; (b) fibras uniaxiais sem adição de PROP; (c) fibras uniaxiais com adição de PROP.**

A curva DTA obtida para o cloridrato de propranolol mostra que essa substância possui perfil cristalino e puro, uma vez que um pico fino endotérmico é observado em 166 °C que corresponde ao ponto de fusão do fármaco, conforme relatado em estudos anteriores [94]. Outro evento endotérmico mais largo é observado em 300 °C e está associado à termod decomposição do PROP. Para o PMAA também são observados dois eventos endotérmicos em aproximadamente 200 e 400 °C, o primeiro está associado à desidratação que ocorre entre grupos carboxílicos vizinhos e o segundo corresponde a total decomposição do polímero [123]. A curva DTA para a poliβCD é apresentada novamente para fins de comparação e sua análise foi apresentada no item 4.1.4.

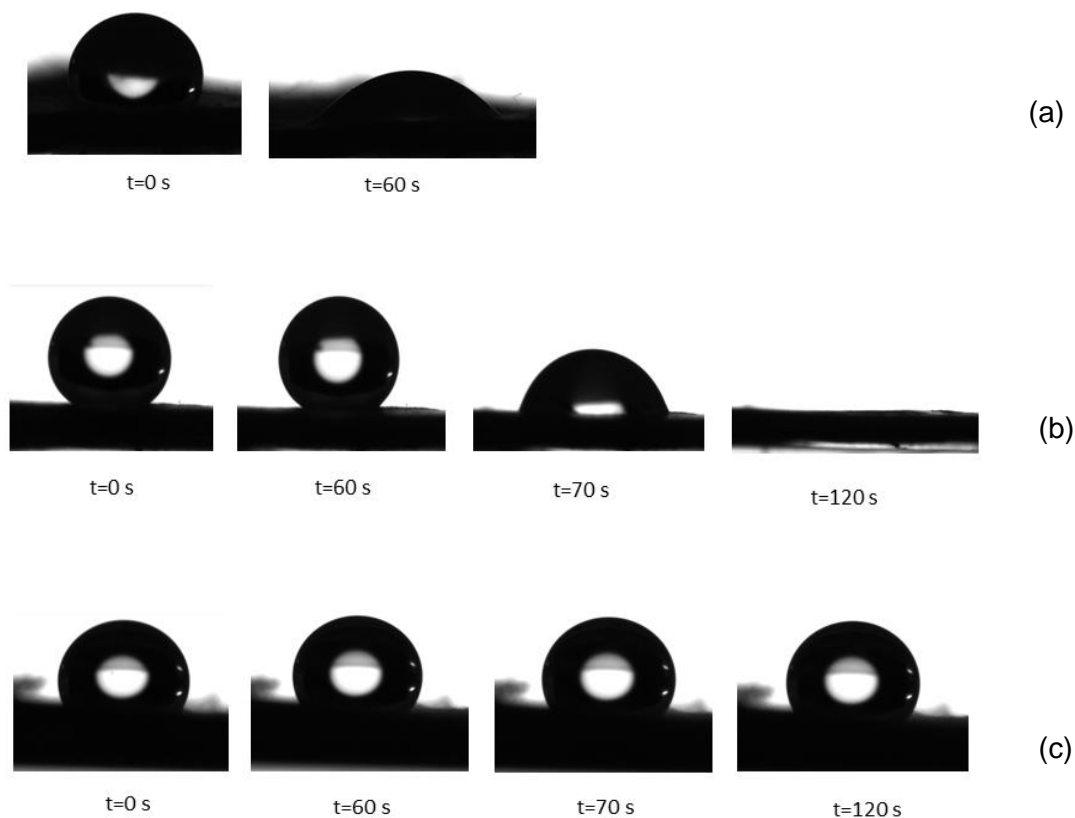
Observa-se nas curvas DTA para todas as fibras uma atenuação dos sinais endotérmicos do PMAA à medida que a proporção de poliβCD aumenta. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento de domínios amorfos da poliβCD e diminuição do domínio cristalino do PMMA livre. Por outro lado, a não observância do pico de fusão do PROP nas

fibras contendo o mesmo pode ser explicado pela completa dispersão nas matrizes poliméricas como observado já na literatura para outros sistemas [130, 131].

Para avaliar as características de hidrofília e hidrofobia da superfície das fibras obtidas após a realização do tratamento térmico, foram realizadas medidas utilizando a técnica de ângulo de contato da água na forma dinâmica. Conforme mencionado anteriormente, os polímeros que constituem as fibras são hidrossolúveis e, dessa maneira, os sistemas constituídos por PMAA, blenda PMAA:poliβCD (80:20) e blenda PMAA:poliβCD (60:40) na presença e ausência de cloridrato de propranolol se dissolvem prontamente em contato com água inviabilizando as medidas.

Foram realizadas medidas do ângulo de contato da água em função do tempo para as superfícies das fibras de PMAA, blenda PMAA:poliβCD (80:20) e blenda PMAA:poliβCD (60:40) após serem submetidas ao tratamento térmico. Pode-se observar que em todos os sistemas a água é absorvida no momento em que entra em contato com as fibras, demonstrando sua grande afinidade por essas superfícies. Ou seja, as diferentes composições das fibras exibem o mesmo padrão de comportamento frente à interação com a água evidenciando que a adição de poliβCD não acarreta mudanças nas características de hidrofília e hidrofobia. Por essa razão, não foi possível determinar o ângulo de contato da água para essas amostras. Contudo, verificou-se que após o contato com a água, as fibras não se dissolviam prontamente como antes fora observado para os sistemas que não passaram pelo aquecimento. Estes resultados apontam para a eficiência do tratamento térmico, o qual conferiu maior resistência às fibras mediante a formação de ligações cruzadas entre os polímeros.

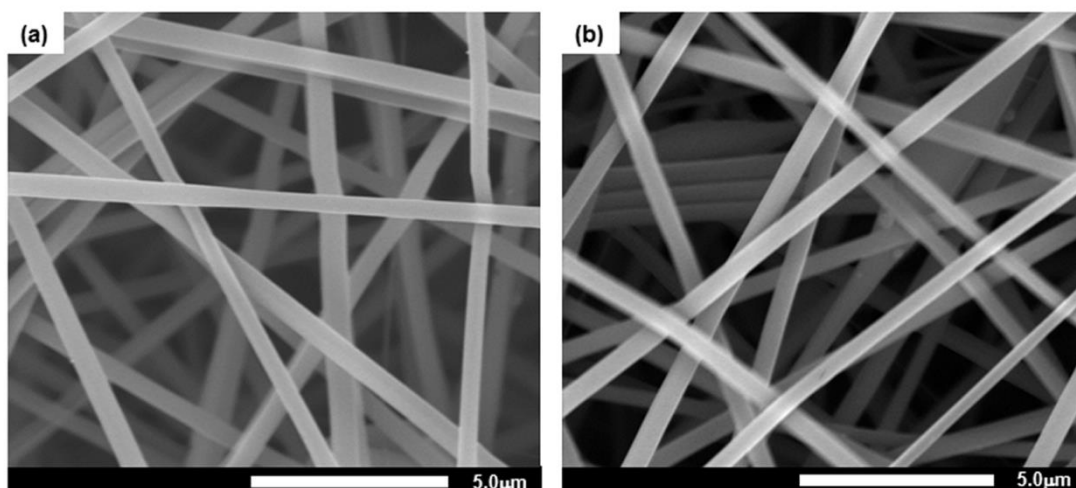
Na Figura 4.18 são apresentadas as imagens do experimento de ângulo de contato da água em função do tempo para as superfícies das fibras de PMAA + PROP, blenda PMAA:poliβCD (80:20) + PROP e blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP após serem submetidas ao tratamento térmico. Analisando as imagens fica evidente que a adição de fármaco interfere nas propriedades de superfície diminuindo inicialmente a interação com a água, contudo à medida que o tempo transcorre as fibras absorvem a água. Pode-se observar que a fibra formada pela blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP apresenta maior resistência à absorção de água no tempo avaliado, sendo que a gota foi absorvida com um tempo estimado em 300 segundos. Este resultado indica que o cloridrato de propranolol pode estar interagindo com a poliβCD presente em maior concentração na referida blenda para produzir um composto que possua menor afinidade com a água.



**Figura 4.18 - Ângulo de contato das gotas de água em função do tempo nas superfícies das fibras após realização de tratamento térmico: (a) PMAA + PROP, (b) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP e (c) blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) + PROP.**

#### **4.2.2 Preparação e caracterização de fibras poliméricas coaxiais contendo cloridrato de propranolol**

Foram preparadas soluções poliméricas de poli $\beta$ CD na concentração de  $250 \text{ mg mL}^{-1}$  para constituir a fibra interna e de PMAA na concentração  $250 \text{ mg mL}^{-1}$  para revesti-la externamente, a fibra foi denominada PMAA(poli $\beta$ CD). Os mesmos sistemas também foram preparados com adição de cloridrato de propranolol na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , o qual foi adicionado à solução de poli $\beta$ CD, e esta fibra foi denominada PMAA(poli $\beta$ CD + PROP). A Figura 4.19 apresenta as micrografias para as fibras obtidas.



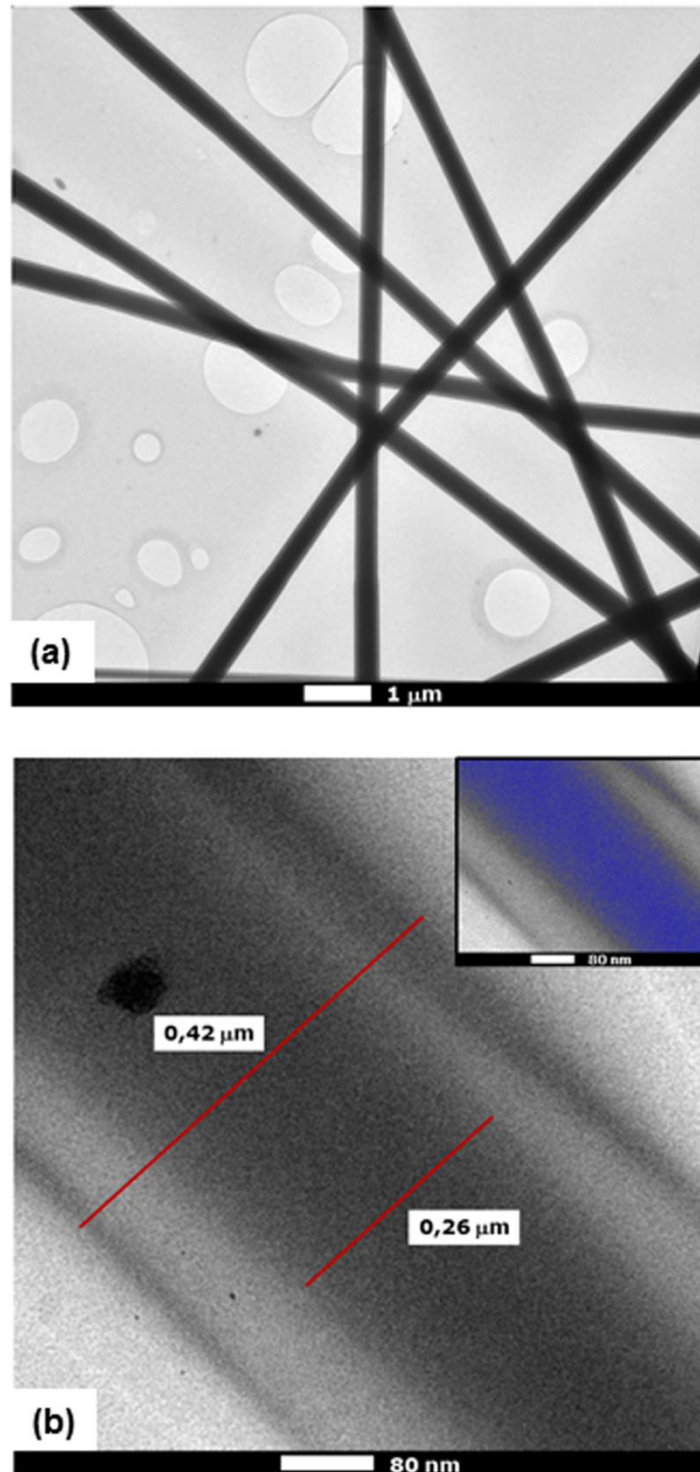
**Figura 4.19 - Micrografias de fibras coaxiais obtidas por eletrofiação com magnificação de 10000x: (a) PMAA(poliβCD); (b) PMAA(poliβCD + PROP).**

Analisando-se as micrografias verifica-se que todas as fibras coaxiais também possuem orientação randômica, morfologia uniforme, não apresentando gotas e nem poros em sua estrutura. O diâmetro médio das fibras e o respectivo desvio padrão são apresentados na Tabela 4.5, na qual podem ser observadas que as fibras produzidas possuem diâmetro nanométrico que não se alteram de forma significativa com a adição do fármaco. Além disso, verifica-se um aumento de cerca de 30 % no diâmetro das fibras coaxiais quando comparadas às fibras uniaxiais, que pode ser atribuído ao uso de diferentes configurações de bico injetor.

**Tabela 4.5 - Diâmetro das fibras coaxiais de PMAA e poliβCD preparadas por eletrofiação.**

<b>FIBRA</b>	<b>DIÂMETRO (nm)</b>
PMAA(poliβCD)	(418 ± 54)
PMAA(poliβCD+PROP)	(404 ± 72)

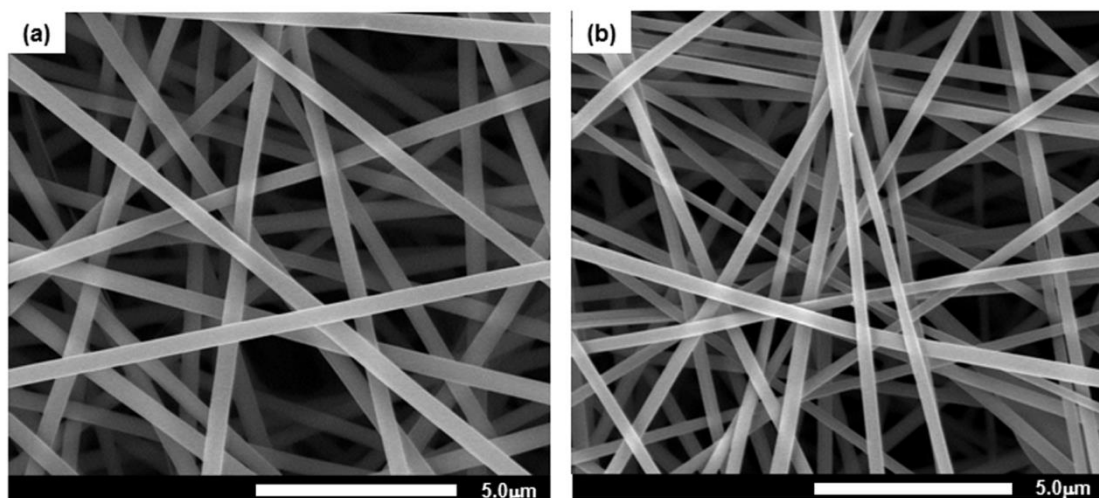
Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a estrutura concêntrica das fibras, nas quais pode ser visualizada uma fronteira nítida clara/escuro entre o polímero que compõe o núcleo (poliβCD) e o polímero que reveste externamente esta estrutura (PMAA), conforme visualizado na Figura 4.20. De acordo com a imagem apresentada, o diâmetro externo é da ordem de 420 nm, dado que é compatível com os valores encontrados por MEV e o diâmetro do núcleo é da ordem de 260 nm.



**Figura 4.20 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para as fibras coaxiais: (a) magnificação de 10000x e (b) magnificação de 230000x.**

As fibras coaxiais foram submetidas ao mesmo tratamento térmico já descrito no item 4.2.1 para as fibras uniaxiais. A Figura 4.21 apresenta as micrografias obtidas para as

fibras poliméricas após o tratamento térmico, nas quais também não são visualizadas mudanças morfológicas decorrentes do aquecimento.



**Figura 4.21 - Micrografias de fibras coaxiais obtidas por eletrofiação após aquecimento com magnificação de 10000x: (a) PMAA(poliβCD); (b) PMAA(poliβCD + PROP).**

A Figura 4.22 apresenta os espectros de absorção no infravermelho para as fibras coaxiais. Embora a técnica de reflectância total atenuada seja eficiente para fornecer informações sobre a superfície das amostras, o grau de penetração do feixe de radiação é de cerca de  $1,66 \mu\text{m}$  [132], o qual é maior que o diâmetro das fibras. Sendo assim, os dados obtidos por esta técnica de análise se referem à fibra como um todo e não somente à região externa das mesmas. Analisando-se os espectros das fibras observa-se que ambas possuem o mesmo perfil, o qual é muito semelhante ao do PMAA, confirmando assim, a presença deste polímero na fibra. Além disso, pode-se observar um ligeiro aumento de intensidade dos modos vibracionais em  $3300 \text{ cm}^{-1}$  e em  $1025 \text{ cm}^{-1}$  quando estes são comparados ao espectro do PMAA. Os modos vibracionais citados são característicos da poliβCD e estão associados aos estiramentos O-H e C-O-C respectivamente. É importante mencionar também que as fibras não apresentam os modos vibracionais do PROP possivelmente devido à sobreposição de bandas dos polímeros na mesma região e que o tratamento térmico resultou no aparecimento do modo vibracional em  $1805 \text{ cm}^{-1}$ , associado à formação do anidrido cíclico.

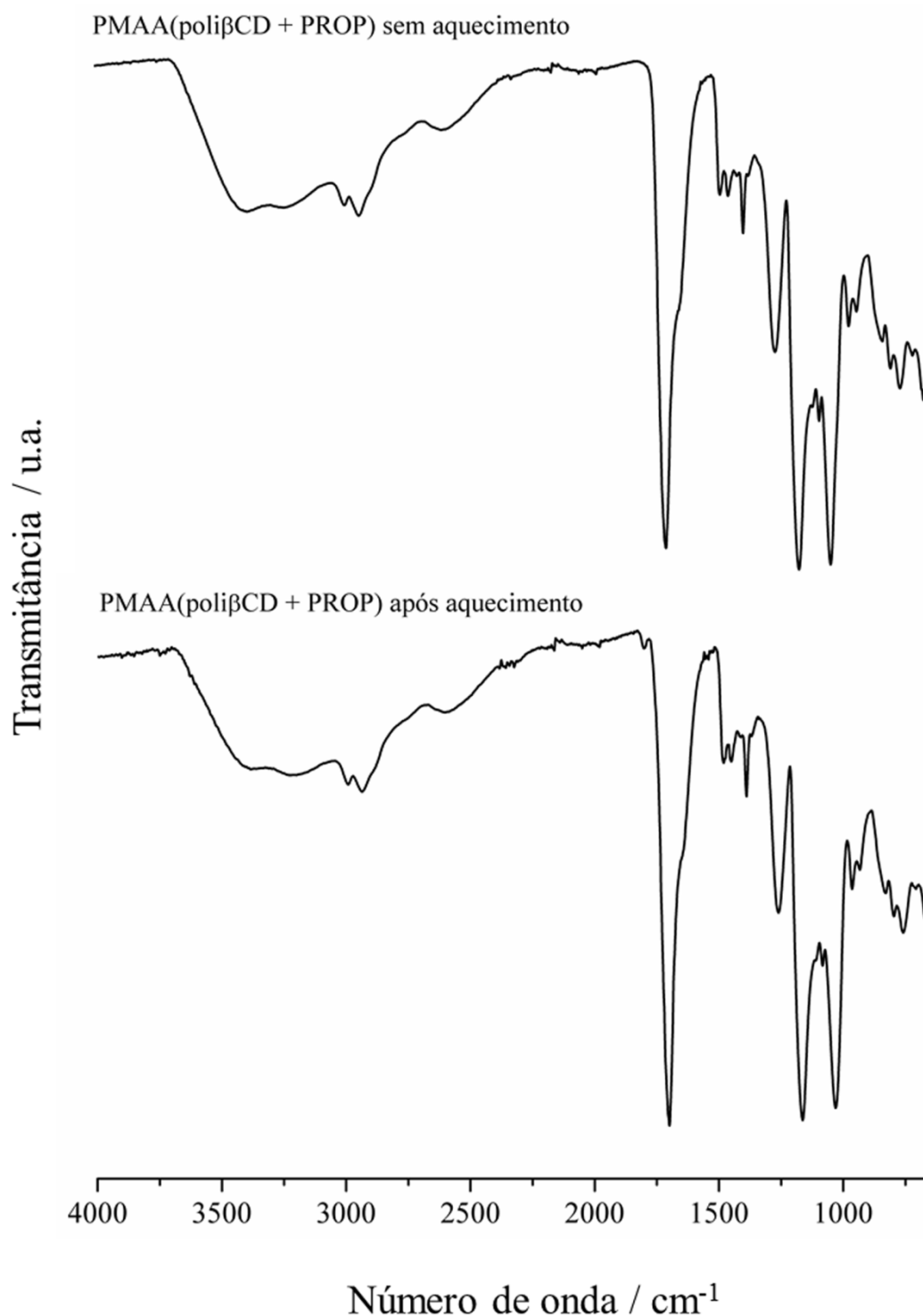
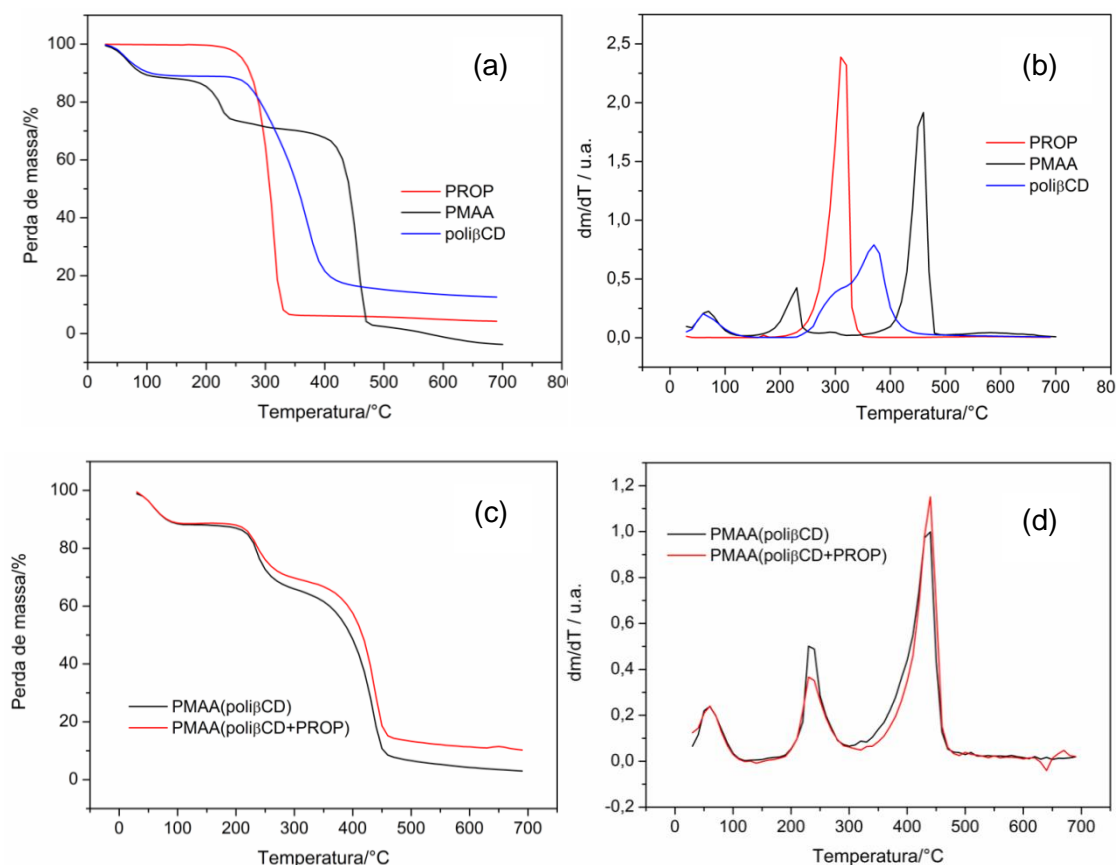


Figura 4.22 - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras coaxiais.

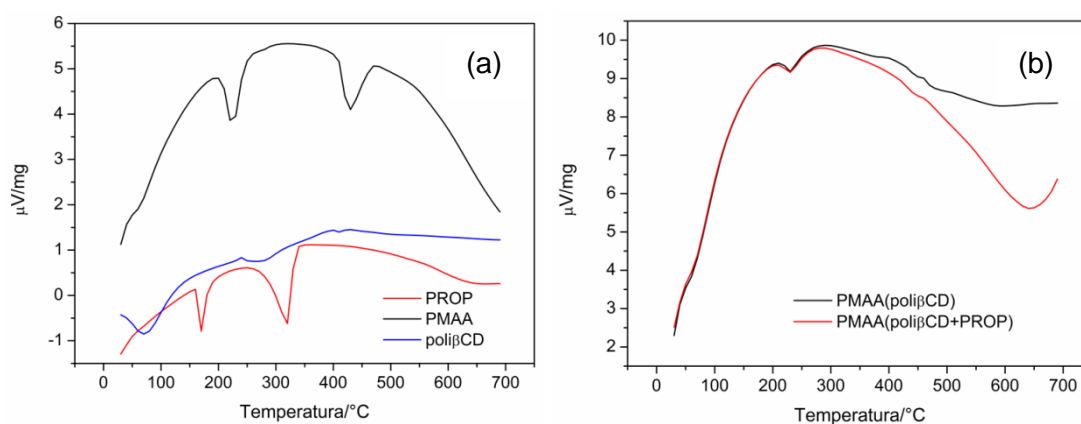
A Figura 4.23 apresenta as curvas TG a DTG para as fibras coaxiais e para os materiais de partida para fins de comparação. Pode-se observar nas curvas para as fibras que ambas apresentam um perfil de termod decomposição semelhante ao do PMAA e que a adição de

PROP causa pequenas alterações em seu perfil e resulta em maior porcentagem de resíduo (cerca de 10 %) quando esta é comparada à fibra sem presença de fármaco. Este resultado sugere novamente uma interação entre a poliβCD e o PROP, conforme demonstrado pelos experimentos de ressonância magnética nuclear apresentados no Capítulo 3 item 3.1.



**Figura 4.23 - Curvas TG e DTG em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>: (a) e (b) PROP, PMAA e poliβCD; (c) e (d) fibras coaxiais sem e com adição de PROP.**

A Figura 4.24 apresenta as curvas DTA para as fibras coaxiais e para os materiais de partida. Nas curvas para as fibras observa-se a atenuação dos sinais endotérmicos do PMAA como consequência do aumento da quantidade de poliβCD na matriz polimérica como discutido acima para as fibras uniaxiais. Nas fibras contendo PROP não se observa a presença do pico de fusão do fármaco, fato que pode sugerir uma dispersão completa do fármaco na matriz [130, 131].

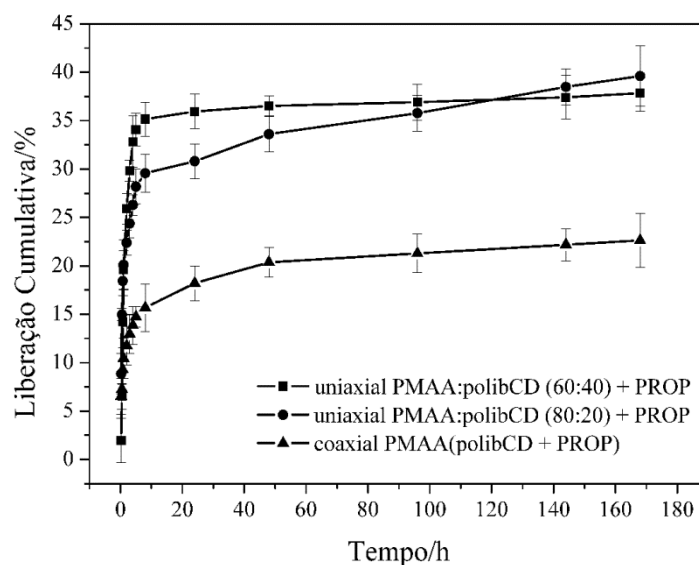


**Figura 4.24 - Curvas DTA em atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ : (a) PROP, PMAA e poli $\beta$ CD; (b) fibras coaxiais sem e com adição de PROP.**

Foram realizadas medidas do ângulo de contato da água em função do tempo para as superfícies das fibras coaxiais de PMAA(poli $\beta$ CD+PROP) após serem submetidas ao tratamento térmico. A gota de água é absorvida no momento em que entra em contato com a superfície, semelhante às fibras de PMAA e blendas sem adição de fármaco, demonstrando sua grande afinidade pela água. Este resultado sugere ainda que a maior concentração de poli $\beta$ CD e de PROP se localizam na parte interna da fibra, caso contrário estes compostos seriam responsáveis por uma menor interação da água com a superfície, conforme demonstrado para as fibras formadas por blendas e PROP. Além disso, verificou-se também que após o contato com a água, as fibras não se dissolviam prontamente. Estes resultados apontam para a eficiência do tratamento térmico para a configuração concêntrica das fibras, que conferiu maior resistência às fibras.

#### **4.3 Estudo da cinética de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol em matrizes de fibras poliméricas de PMAA e poli $\beta$ CD**

A Figura 4.25 apresenta as curvas de porcentagem de liberação cumulativa de cloridrato de propranolol disperso em fibras poliméricas uniaxiais formadas pelas blendas PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP e PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) + PROP, bem como para as fibras coaxiais. Não foi possível obter o perfil de liberação para as fibras de PMAA contendo PROP, pois as mesmas se dissolvem após 15 minutos de imersão em tampão fosfato, liberando aproximadamente 100% de fármaco, assim, estas fibras não exibem controle sobre a liberação do propranolol.



**Figura 4.25 - Curvas de porcentagem de liberação cumulativa de cloridrato de propranolol disperso em fibras uniaxiais e coaxiais de PMAA e poliβCD.**

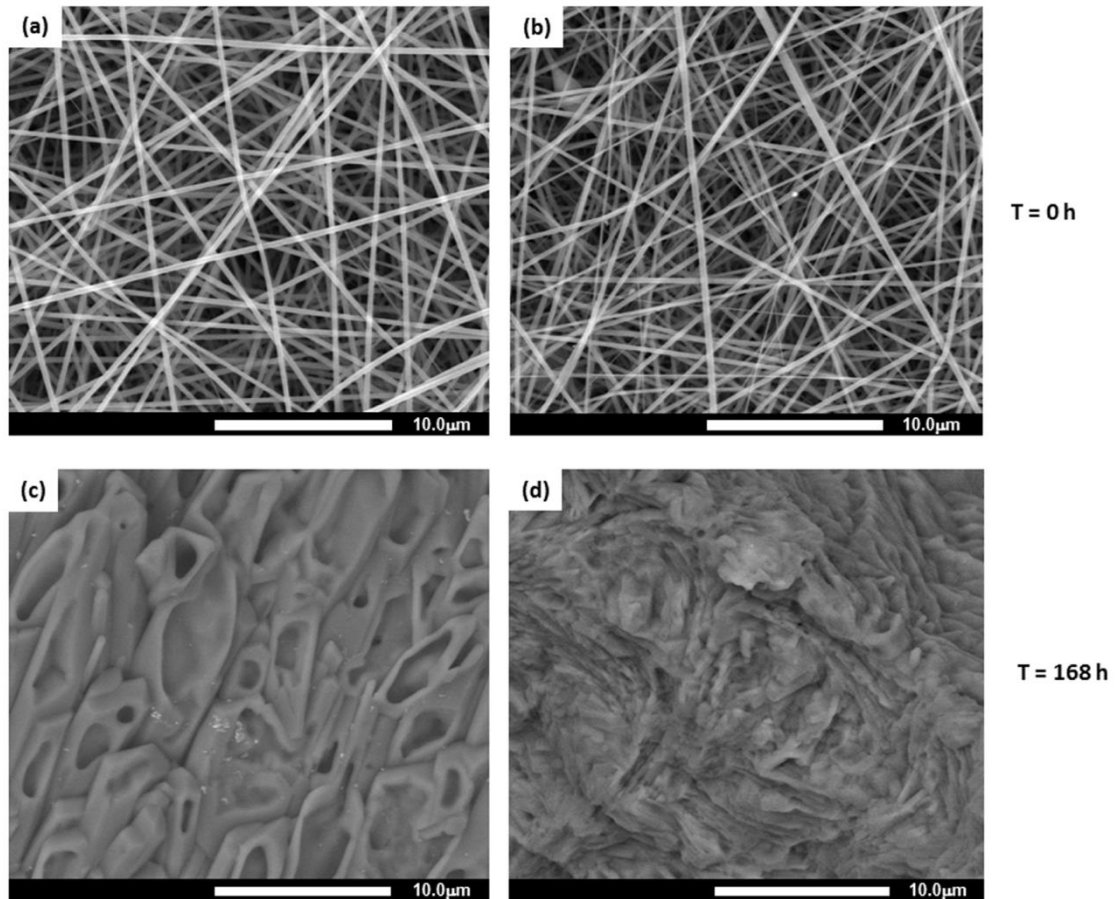
Analisando-se os perfis de liberação para as fibras uniaxiais, verifica-se que ambas apresentam efeito de explosão nas primeiras 8 horas do experimento, nas quais a liberação cumulativa do fármaco foi de 30 e 35 % para as fibras PMAA:poliβCD (80:20) + PROP e PMAA:poliβCD (60:40) + PROP, respectivamente. Assim, a matriz que possui a maior porcentagem de poliβCD em sua constituição apresentou 5 % a mais de liberação de efeito de explosão. Esta ligeira diferença está em contraste com o esperado para a matriz mais hidrofóbica de PMAA:poliβCD (60:40) que por apresentar maior porcentagem de poliβCD, ou seja, maior presença de cavidades para interação, poderia modular de forma mais eficaz a liberação do fármaco. Tal fato pode estar associado ao maior grau de reticulação da referida matriz, que pode ocasionar em impedimento estérico e dificultar a complexação do PROP.

Foi constatado que em 168 horas os dois sistemas liberaram percentuais semelhantes de fármaco, cerca de 40 %. Este resultado demonstra que o aumento da porcentagem de poliβCD na matriz polimérica não interferiu na cinética de liberação do fármaco. Uma possível explicação para os dados obtidos está baseada na estrutura e composição das fibras, as quais são constituídas por blendas, e dessa forma, os polímeros e o fármaco encontram-se dispersos por toda extensão do material. Devido ao caráter hidrossolúvel da poliβCD, parte das fibras pode ter sido desfeita, mesmo após o tratamento térmico, causando a rápida liberação do fármaco.

O perfil de liberação para as fibras coaxiais mostra que a liberação cumulativa de cloridrato de propranolol nas primeiras 8 horas foi de 14 %, ou seja, 44 % menor que as fibras uniaxiais. Verificou-se ainda que em 168 horas foram liberados 23 % de fármaco, o que corresponde a cerca de 58 % menos que as fibras uniaxiais. Este resultado indica que a estrutura concêntrica da fibra é um importante fator para modular a liberação do cloridrato de propranolol. Essa observação pode ser explicada pela alta porcentagem de poli $\beta$ CD presente no núcleo da fibra, que quando comparada à quantidade dispersa nas fibras uniaxiais, pode ocasionar a interação do fármaco com outras cavidades disponíveis. Dessa forma, ocorre uma diminuição da quantidade de fármaco liberada e sua difusão através da matriz e diminui o efeito de explosão. Portanto, as fibras coaxiais podem modular a liberação de PROP de forma mais eficiente demonstrando ser uma estratégia útil para a liberação de fármacos hidrofílicos.

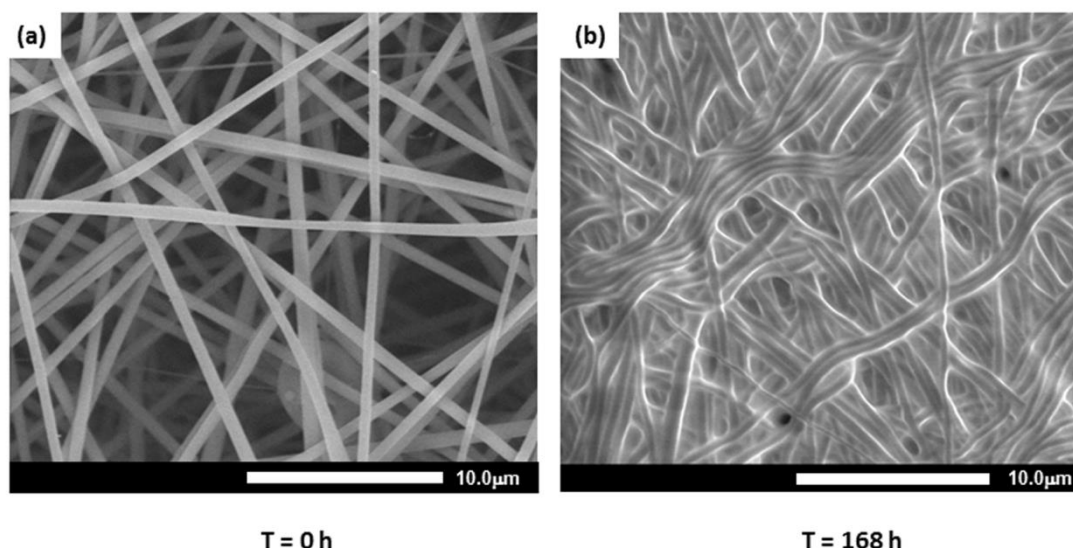
O resultado apresentado está de acordo com estudos recentes que demonstram que fibras poliméricas com estrutura coaxial têm sido utilizadas como uma estratégia eficiente para modular a cinética de liberação de diversos fármacos que são incorporados ao polímero do núcleo [133-135]. Sohrabi e colaboradores (2013) desenvolveram um sistema de liberação baseado em nanofibras coaxiais de poli(metilmetacrilato)(PMMA)-nylon-6 contendo ampicilina como fármaco hidrofílico modelo. Os autores observaram que o sistema era capaz de liberar o fármaco de maneira controlada [136]. Tiwari e colaboradores (2010) reportaram que existe uma clara diferença nos perfis de liberação de cloridrato de metoclopramida incorporado em fibras uniaxiais de poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(ácido lático), poli(lático-co-glicólico) e álcool polivinílico comparadas com fibras coaxiais nas quais o álcool polivinílico é o núcleo e os demais polímeros são a região externa da fibra [134].

A Figura 4.26 apresenta as micrografias para as fibras uniaxiais constituídas pelas blendas de PMAA:poli $\beta$ CD (80:20) + PROP e blenda PMAA:poli $\beta$ CD (60:40) + PROP, após 168 horas de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol. Pode-se observar que após esse período ocorreu o total colapso da estrutura das fibras e a formação de um filme rugoso.



**Figura 4.26 - Micrografias de fibras uniaxiais antes e após 168 horas de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol com magnificação de 5000x: (a) e (c) blenda PMAA:poliβCD (80:20) + PROP; (b) e (d) blenda PMAA:poliβCD (60:40) + PROP.**

Figura 4.27 apresenta as micrografias para as fibras coaxiais após 168 horas de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol. Pode-se observar que após esse período a estrutura das fibras foi mantida parcialmente, fato que corrobora com a maior modulação de liberação do fármaco.



**Figura 4.27 - Micrografias de fibras coaxiais antes e após 168 horas de liberação *in vitro* de cloridrato de propranolol com magnificação de 5000x: (a) antes da liberação (b) após 168 horas de liberação.**

Deve-se ressaltar que as matrizes poliméricas que compõem as fibras uniaxiais e coaxiais demonstraram grande afinidade pelo cloridrato de propranolol, uma vez que em 168 horas de ensaio as mesmas liberaram em média 40 e 23 % do fármaco incorporado, respectivamente. Assim, o restante do fármaco permanece incorporado nas matrizes. Este comportamento pode ser compreendido pelas interações existentes entre fármaco/poliβCD e fármaco/PMAA. As interações do tipo hóspede-hospedeiro estabelecidas entre as cavidades da βCD e o PROP já foram comprovadas neste estudo por experimentos de RMN. As interações entre os grupos ácidos do PMAA e o PROP foram sugeridas pelos resultados de infravermelho e análise térmica das fibras. Estudos anteriores também demonstraram a afinidade de outros fármacos por polímeros acrílicos e sua consequente retenção na matriz após a condução de experimentos de liberação *in vitro*. Segundo Silva (2006), hidrogéis sintetizados a base de PMAA e poli(N-isopropilacrilamida) - P(N-iPAAm) apresentaram a maior incorporação do fármaco anti-hipertensivo atenolol à medida que a proporção de PMAA crescia na matriz e também a maior retenção do mesmo em experimentos de liberação *in vitro* [137]. Sousa e colaboradores (2005) observaram comportamento semelhante para hidrogéis formados pelos mesmos polímeros e o fármaco anti-hipertensivo cloridrato de diltiazem [126]. Ainda de acordo com Ende e Peppas (1997) a incorporação e liberação do anti-hipertensivo oxoprenolol em matrizes de poli(ácido acrílico) foi afetada por interações fármaco/polímero [127].

Diferentes modelos matemáticos têm sido apresentados na literatura com o objetivo de avaliar a cinética de liberação de fármacos, bem como sugerir a natureza de seu mecanismo de liberação da matriz polimérica. Os principais mecanismos para matrizes poliméricas são: a difusão, erosão e o intumescimento, podendo haver também a combinação de mais de um tipo de mecanismo para o mesmo dispositivo. Nesse sentido, modelos empíricos e semi-empíricos são modelos simples que apresentam como maior vantagem o fornecimento de informações preliminares sobre o transporte de massa do fármaco para o meio externo. A identificação e compreensão destes mecanismos é o primeiro passo para o desenvolvimento e otimização de novos dispositivos [138].

Dentre os modelos empíricos e semi-empíricos podem ser citados o de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell [139]. No modelo de ordem zero a dissolução do fármaco acontece de forma lenta, com a fração dissolvida (Q) variando linearmente com o tempo (t), independente da concentração, conforme mostra a Equação 4.7, na qual a constante  $k_0$  representa a constante de dissolução aparente de ordem zero obtida através da inclinação da curva Q x t.

$$Q(t) = k_0 t \quad \text{Eq. 4.7}$$

No modelo de primeira ordem a fração do fármaco dissolvido varia de forma logarítmica com o tempo, de acordo com a Equação 4.8, na qual k representa a constante de dissolução de primeira ordem, determinada pela inclinação da curva Log (Q) x t.

$$\text{Log}Q(t) = kt \quad \text{Eq. 4.8}$$

De acordo com o modelo descrito por Higuchi a fração do fármaco dissolvido varia com a raiz quadrada do tempo, conforme apresentado pela Equação 4.9, na qual que  $k_H$  representa a constante de dissolução de Higuchi, determinada pela inclinação da curva Q(t) x  $t^{1/2}$ .

$$Q(t) = k_H t^{1/2} \quad \text{Eq. 4.9}$$

Já no modelo descrito por Hixson-Crowell a fração do fármaco dissolvido varia em função do tempo ao cubo, conforme a Equação 4.10, no qual  $k_s$  é a constante de dissolução de Hixson-Crowell, determinada pela inclinação da curva Q x  $t^3$ .

$$Q(t) = k_s t^3 \quad \text{Eq. 4.10}$$

Baseado nos modelos citados acima foi possível determinar matematicamente os perfis das cinéticas de liberação de cloridrato de propranolol nas fibras uniaxiais e coaxiais. A Tabela 4.6 apresenta os respectivos valores para os coeficientes de correlação ( $R^2$ ,  $P_{\text{valor}}$ ) para cada modelo.

**Tabela 4.6 - Parâmetros obtidos na modelagem da cinética de liberação de cloridrato de propranolol a partir das fibras uniaxiais e coaxiais de PMAA e poliβCD.**

MODELOS	FIBRA UNIAXIAL PMAA:poliβCD (80:20)		FIBRA UNIAXIAL PMAA:poliβCD (60:40)		FIBRA COAXIAL	
	$R^2$	$P_{\text{valor}}$	$R^2$	$P_{\text{valor}}$	$R^2$	$P_{\text{valor}}$
Ordem zero	0,7784	0,0010	0,5288	0,0519	0,8132	0,0004
Primeira ordem	0,6447	0,0128	0,3965	0,1604	0,7211	0,0036
<b>Higuchi</b>	<b>0,8697</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,6553</b>	<b>0,0109</b>	<b>0,9109</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
Hixson-Crowell	0,6360	0,0145	0,3904	0,1675	0,6431	0,0131

Os sistemas estudados apresentam uma cinética de liberação que se aproxima mais do modelo de Higuchi, uma vez que os coeficientes de correlação são maiores quando este modelo é aplicado. De acordo com Costa e Lobo (2001), o modelo de Higuchi aplica-se à liberação de fármacos a partir de matrizes sólidas e semi-sólidas. A entrada de líquido na matriz promove dissolução do fármaco e sua consequente difusão até a superfície do polímero [140]. É importante mencionar ainda que estudos têm demonstrado que o mecanismo de difusão tem sido predominantemente associado à cinética de liberação de fármacos em matrizes que contém polímeros não biodegradáveis, como o PMAA, bem como polímeros que passaram por processos para formação de ligações cruzadas, como o sistema PMAA e poliβCD. Nestes casos, a difusão ocorre devido à maior concentração das moléculas na matriz polimérica e a força motriz para a liberação é a existência do gradiente de concentração entre a fibra e o meio [65].

Pode ser observado que o sistema que mais se aproxima do referido modelo corresponde às fibras coaxiais. O aumento da porcentagem de poli $\beta$ CD nas fibras uniaxiais acarreta em diminuição do coeficiente de correlação e conseqüente afastamento do modelo. Tal fato pode estar associado com o colapso da estrutura dessas fibras, o qual foi observado por MEV após a realização do experimento de liberação *in vitro*. Outra explicação para esses valores dos coeficientes de correlação serem relativamente baixos é que a liberação do fármaco a partir dessas matrizes pode acontecer através de uma mistura de mecanismos como relatado na literatura para outros sistemas.

# ***CAPÍTULO 5***

## ***Resultados e Discussão***

---

*Sistema de liberação de cloridrato de daunorubicina em  
matrizes poliméricas*

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

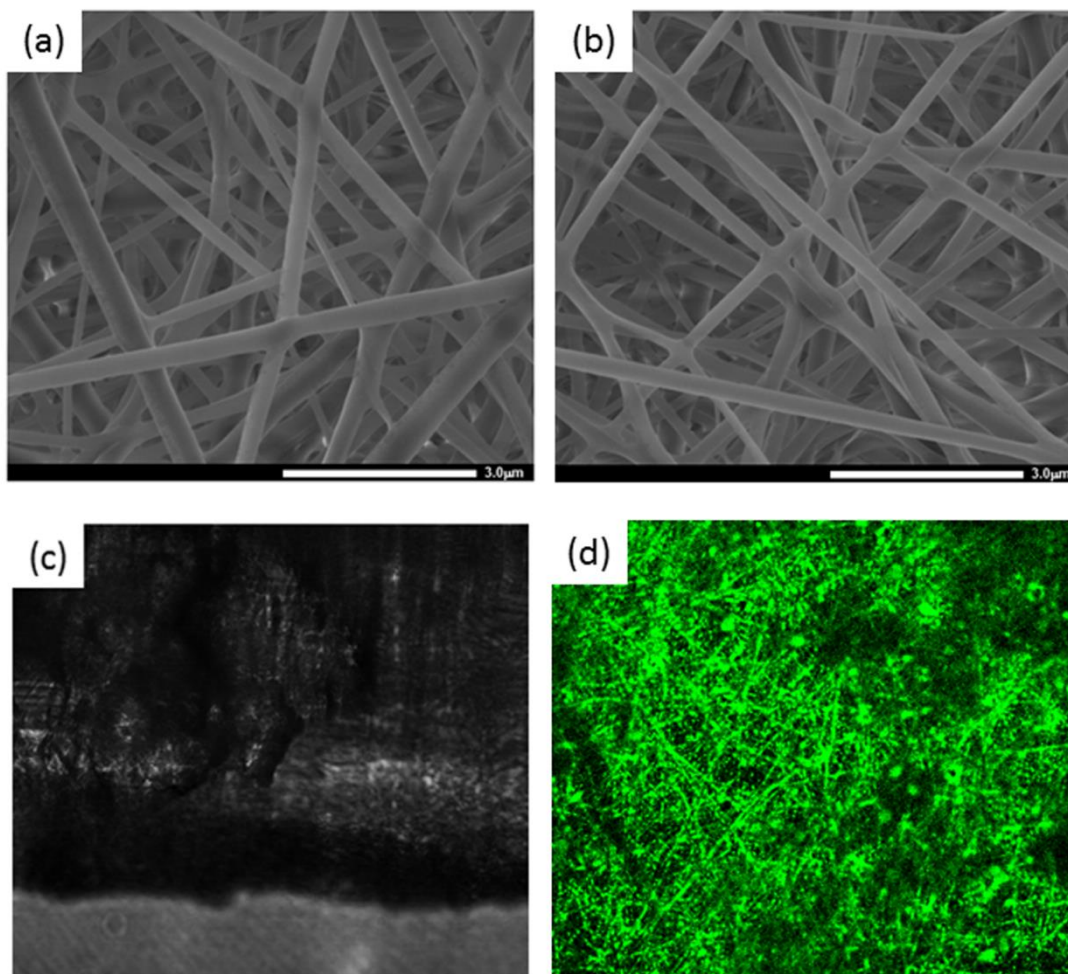
Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para as fibras poliméricas uniaxiais de cloridrato de daunorubicina em matriz de poli(lático-co-glicólico) (PLGA), as quais foram obtidas por eletrofiação. A obtenção deste único arranjo de fibra tem por objetivo avaliar a existência de efeitos de explosão e posterior liberação mais lenta do fármaco, uma vez que para o tratamento do câncer estas condições são desejáveis.

As fibras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e de fluorescência confocal, espectroscopia na região do infravermelho por reflectância total atenuada, análise térmica, difração de raios-X, bem como foi avaliada a cinética de liberação *in vitro* de daunorubicina. Posteriormente, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o efeito citotóxico, inflamatório e anti-angiogênico das fibras preparadas.

### **5.1 Preparação e caracterização de fibras poliméricas de cloridrato de daunorubina em matriz de PLGA**

A Figura 5.1(a) e (b) apresentam as micrografias para as fibras de PLGA e de PLGA contendo daunorubicina (PLGA-DNR), nas quais se pode verificar que o processo de eletrofiação foi eficiente para obter as fibras descritas. Analisando as imagens obtidas por MEV verifica-se que as fibras de PLGA possuem orientação randômica, morfologia uniforme, não apresentando gotas e nem poros em sua estrutura com diâmetro nanométrico de  $(270 \pm 60)$  nm. A adição de DNR ao polímero não afetou a morfologia da fibra, as quais apresentaram um diâmetro médio de  $(262 \pm 33)$  nm.

A distribuição do fármaco pode ser analisada em maior detalhe utilizando as imagens de microscopia de fluorescência confocal, uma vez que a daunorubicina é fluorescente no comprimento de onda e excitação de 488 nm e de emissão de 575 nm. Para efeito de comparação foram obtidas também imagens para as fibras de PLGA isentas de fármaco. Analisando a imagem de microscopia de fluorescência confocal obtida para as fibras de PLGA, Figura 5.1(c) observa-se que o polímero não é fluorescente no comprimento de onda avaliado. Já a fibra de PLGA-DNR, Figura 5.1(d), mostrou grande intensidade de fluorescência, assim, pode-se perceber que o fármaco foi uniformemente incorporado ao longo da superfície das fibras.



**Figura 5.1 - Imagens de microscopia: (a) MEV para as fibras de PLGA com magnificação de 10.000x, (b) MEV para as fibras de PLGA-DNR com magnificação de 10.000x, microscopia de fluorescência confocal para as fibras de PLGA com magnificação de 63x e (d) microscopia de fluorescência confocal para as fibras de PLGA-DNR com magnificação de 63x.**

Análises de espectroscopia na região de infravermelho foram realizadas para verificar se o processo de eletrofiação afetou a estrutura química do polímero e para confirmar a incorporação da DNR nas fibras. A Figura 5.2 apresenta os espectros na região do infravermelho obtidos para as fibras de PLGA, PLGA-DNR, bem como para a DNR e PLGA puros.

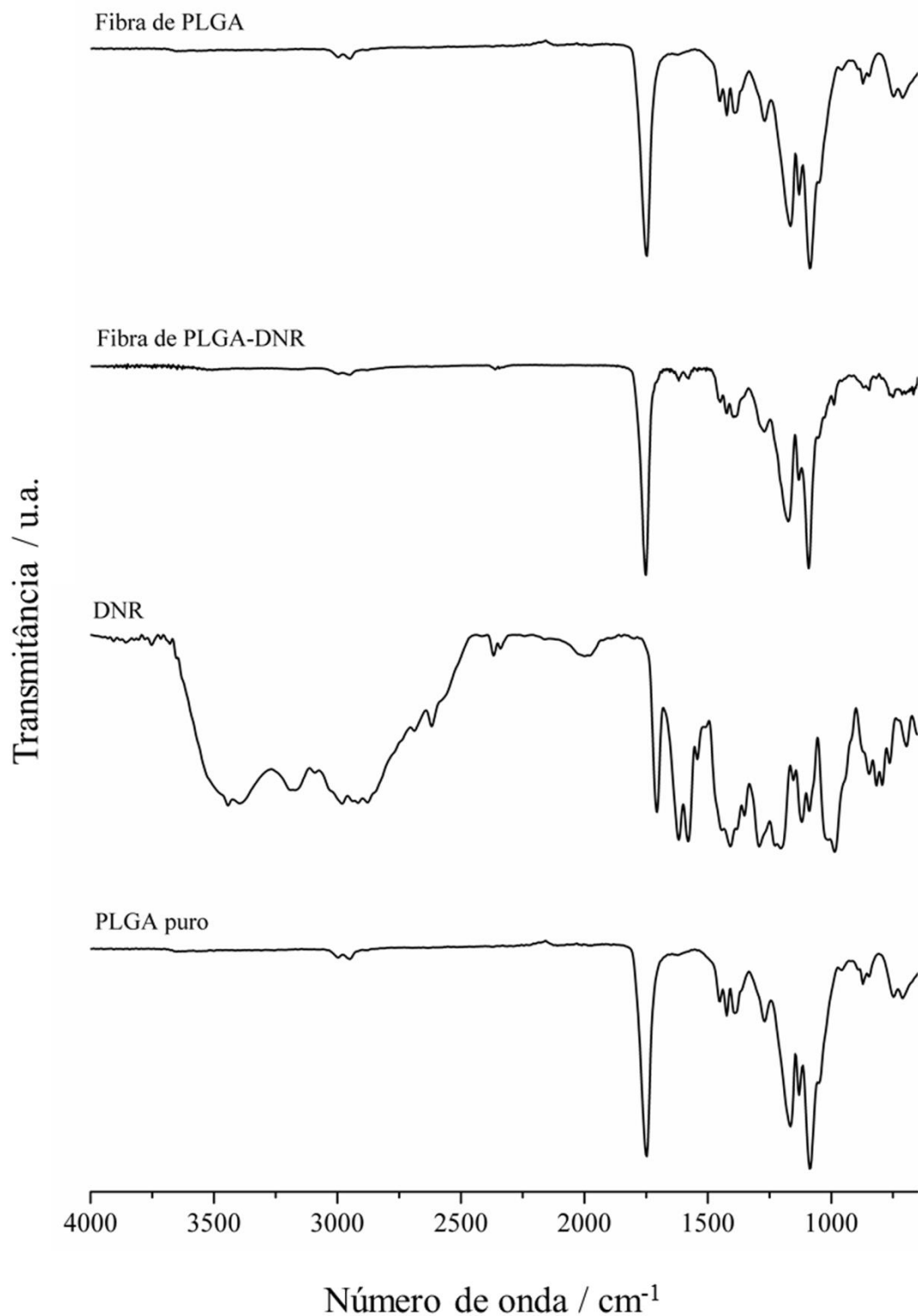


Figura 5.2 - Espectros de absorção na região do infravermelho para fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros.

O espectro para o PLGA puro e para suas fibras exibem os mesmos modos vibracionais característicos: em  $1750\text{ cm}^{-1}$  tem-se ao estiramento C=O da ligação éster; em  $1456\text{ cm}^{-1}$  são observados os estiramentos simétricos e assimétricos da ligação C-H; outros modos são observados em  $1260$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos do grupo éter C-O-C e C-O respectivamente. É importante salientar que a similaridade entre os espectros é um indicativo de que os solventes utilizados na preparação das fibras de PLGA (DMF/THF) evaporaram durante o processo de eletrofiação [141, 142]. Para a molécula de daunorubicina os principais modos vibracionais estão relacionados na Tabela 5.1, os quais estão de acordo com a literatura [143, 144]. O espectro de infravermelho para a fibra de PLGA-DNR exhibe modos vibracionais característicos da daunorubicina observados em 1619-1583 e abaixo de  $750\text{ cm}^{-1}$  indicando que o fármaco foi incorporado com sucesso na matriz polimérica. Os demais modos vibracionais estão sobrepostos com os modos do PLGA.

**Tabela 5.1 - Relação dos principais modos vibracionais da molécula de cloridrato de daunorubicina.**

REGIÃO ( $\text{cm}^{-1}$ )	ATRIBUIÇÃO TENTATIVA
3440-3190	v O-H
1711	v C=O de cetona
1619-1583	v de ligação de hidrogênio intramolecular de quinona
1285	v C-O-C
1116	Álcool terciário
1087	Álcool secundário

A Figura 5.3 apresenta os difratogramas de raios-X para as fibras de PLGA, PLGA-DNR, bem como para a DNR e PLGA puros. Não são observados picos de difração para o PLGA puro, verifica-se apenas um halo de amorficidade entre  $10$  e  $30^\circ 2\theta$  indicando que esta substância encontra-se na forma amorfa e, assim, exhibe organização a curtas distâncias entre os planos cristalinos. O perfil de difração exibido pela DNR mostrou numerosos picos distintos entre  $5$  e  $30^\circ 2\theta$ , sendo que mais intensos são observados nos seguintes valores de  $2\theta$ :  $5,1090$  -  $7,2694$  -  $11,4970$  -  $15,0541$  e  $23,0209$ . Este resultado indica que este fármaco, na forma como foi adquirido, apresenta-se como um material cristalino.

Os difratogramas de raios-X para as fibras de PLGA e PLGA-DNR apresentaram perfis de difração compatíveis com substâncias amorfas. As fibras de PLGA-DNR não apresentaram picos de difração referentes à presença da DNR na forma cristalina. Dessa forma, os dados mostram que a DNR foi aleatoriamente distribuída nas fibras na forma amorfa durante sua preparação. Estes resultados podem ser explicados porque os polímeros e outros compostos não têm tempo hábil para cristalizar e formar estruturas organizadas durante o processo de eletrospinação, que é um método muito rápido para a preparação de fibras poliméricas [145]. Outros estudos já haviam demonstrado resultados semelhantes utilizando concentrações similares de fármacos em matrizes poliméricas. Demirci e colaboradores (2014), observaram que ciprofloxacino na concentração de 5 % m/m em matriz de poli(ácido 4- vinilbenzóico-co-cloreto de vinilbenzil trimetilamônio) não mostraram o comportamento cristalino exibido pelo fármaco em sua forma pura [146]. Em outro estudo desenvolvido por Xie e colaboradores (2010), foi relatado que fibras de poli(lático-co-glicólico)-poli(etilenoglicol) contendo hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e o fármaco antitumoral hidroxiamptotecina nas concentrações de 1,0; 2,0 e 5,0 % m/m exibiram perfis amorfos em difratogramas de raios-X e curvas DSC [130].

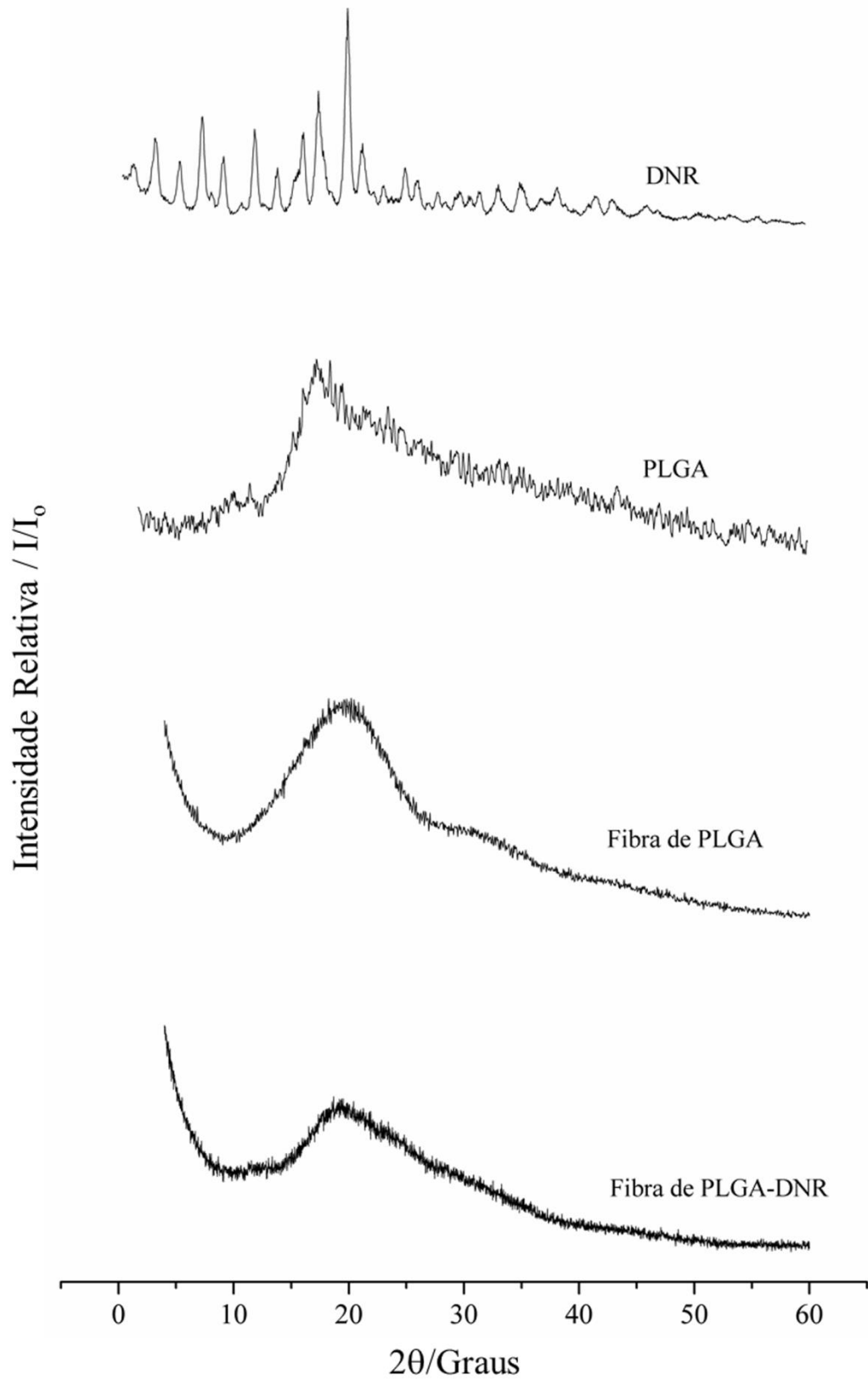
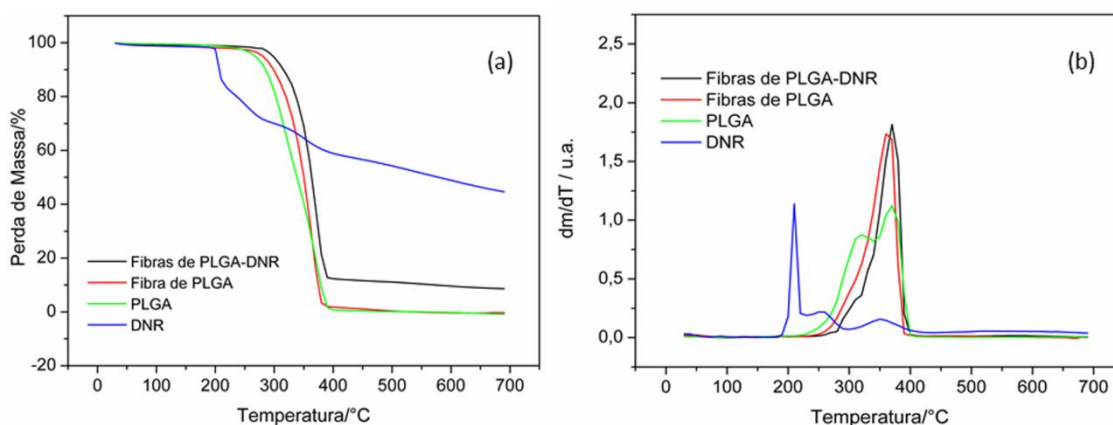


Figura 5.3 - Difratogramas de raios-X para as fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros obtidos em tubo de cobre utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,54051$ .

Assim, para corroborar os resultados obtidos por difração de raios-X, foram avaliadas as propriedades térmicas das fibras de PLGA, PLGA-DNR, DNR e PLGA puros. A Figura 5.4 apresenta as curvas TG/DTG para as amostras citadas. Analisando-se a curva TG para a daunorubicina observa-se que a mesma possui estabilidade térmica até aproximadamente 200 °C, seguida por três eventos de perda de massa que podem ser melhor visualizados na curva DTG e que totalizam 53,5 % de perda até 700 °C com conseqüente formação de grande quantidade de resíduo sólido. A alta estabilidade térmica para esta substância pode ser atribuída à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares requerendo maiores temperaturas para decomposição. As curvas TG para o PLGA puro e para a fibra de PLGA apresentam comportamento térmico semelhante com completa perda de massa em 250 °C, indicando completa decomposição desses materiais conforme reportado na literatura [147]. As fibras de PLGA-DNR exibem maior estabilidade térmica ligeiramente maior que as fibras de PLGA com perda de massa em 275 °C e um resíduo sólido de 10,2 % foi gerado, fato que pode ser atribuído à incorporação da DNR na matriz polimérica e a interações do tipo não covalentes entre este fármaco e o polímero. É importante mencionar que não foram observados eventos de perda de massa que pudessem ser atribuídos à saída de solventes (DMF/THF) utilizados para preparar as fibras, indicando que as mesmas estavam isentas dos mesmos.

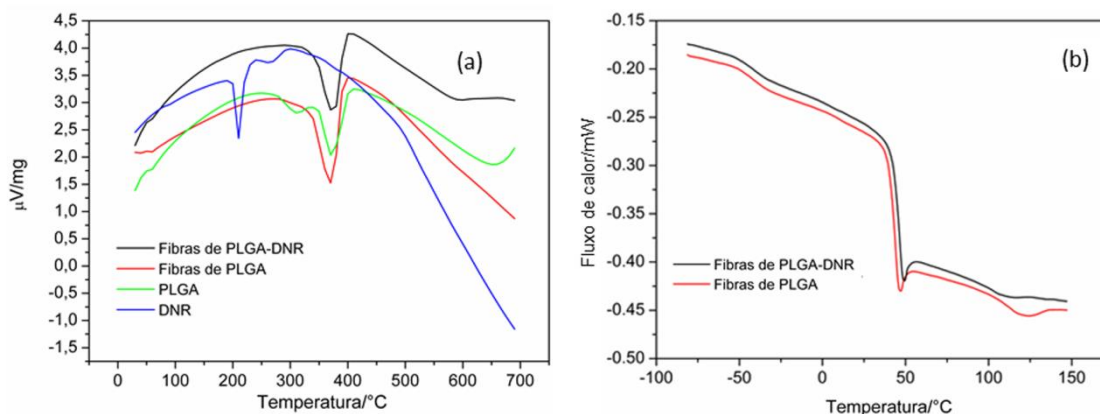


**Figura 5.4 - Curvas TG e DTG para as fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros obtidas em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>.**

A Figura 5.5 apresenta as curvas DTA e DSC para as fibras de PLGA, PLGA-DNR, DNR e PLGA puros. A curva DTA para a daunorubicina exibe um evento endotérmico a 207,8 °C que corresponde ao ponto de fusão seguido de decomposição térmica [13]. As curvas para o PLGA puro e para as fibras de PLGA mostram dois eventos térmicos, sendo o primeiro a 50,5 °C e o

segundo na faixa de 300 a 400 °C, os quais correspondem à transição vítrea do polímero e à sua termodecomposição respectivamente [147, 148].

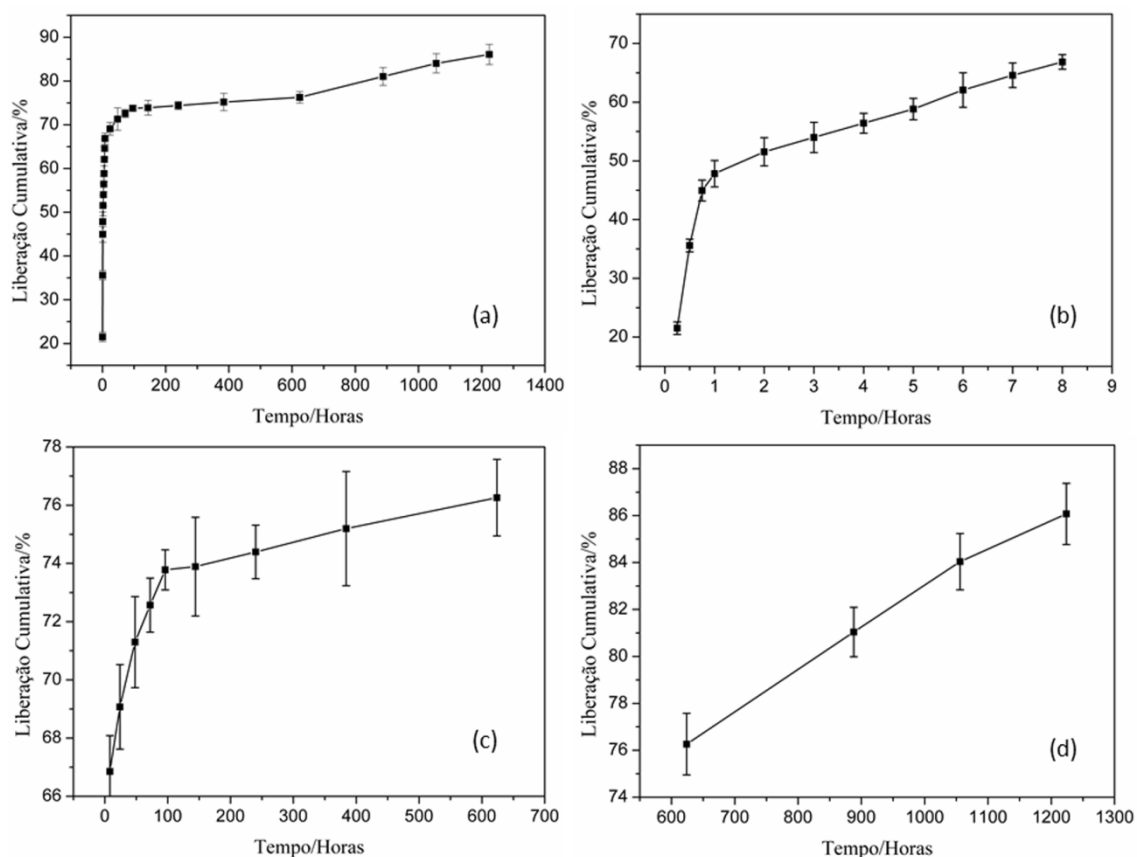
As curvas DTA para as fibras de PLGA-DNR exibiram o mesmo intervalo de decomposição térmica observada para as fibras de PLGA. Contudo, a temperatura de transição vítrea sofreu um ligeiro aumento, sendo observada a 53,9 °C, a qual pode ser melhor visualizada na curva DSC também apresentada na Figura 5.4. A temperatura de transição vítrea pode ser entendida como a temperatura abaixo da qual um polímero amorfo se torna duro e frágil (estado vítreo), e acima da qual o mesmo polímero encontra-se macio (estado viscoelástico). Assim, pode-se inferir que este resultado reforça a hipótese de que interações entre a daunorubicina e o PLGA produzem uma matriz mais rígida, a qual precisa de maiores temperaturas para atingir o estado viscoelástico. Analisando ainda a curvas DTA para as fibras de PLGA-DNR, pode-se observar a ausência do pico de fusão da daunorubicina, indicando que o fármaco está distribuído em sua forma amorfa. Estes resultados estão em conformidade com os perfis obtidos por difração de raios-X de pó para as referidas amostras e com o estudo realizados por Ranganath e Wang (2008), no qual o fármaco anti-tumoral paclitaxel foi incorporado em fibras de PLGA e as mesmas não exibiram o pico de fusão associado ao fármaco em curvas DSC [131].



**Figura 5.5 - (a) Curvas DTA para as fibras de PLGA, fibras de PLGA-DNR, DNR e PLGA puros e (b) Curvas DSC para fibras de PLGA e de PLGA-DNR obtidas em atmosfera de N<sub>2</sub>.**

### **5.2 Estudo da cinética de liberação *in vitro* de cloridrato de daunorubicina em matriz de fibra polimérica de PLGA**

A Figura 5.6 apresenta as curvas de porcentagem de liberação cumulativa de daunorubicina dispersa em fibras poliméricas uniaxiais de PLGA.



**Figura 5.6 - Curvas de porcentagem de liberação cumulativa de cloridrato de daunorubicina dispersa em fibras de PLGA (a) porcentagem de liberação cumulativa até 1224 horas, (b) porcentagem de liberação cumulativa até 8 horas, (c) porcentagem de liberação cumulativa entre 8 a 624 horas e (d) porcentagem de liberação cumulativa entre 624 a 1224 horas.**

Analisando a Figura 5.6 pode-se constatar que em 1224 horas as fibras liberaram 90 % de daunorubicina para o meio externo. Três domínios distintos podem ser distinguidos na curva de liberação apresentada. O primeiro domínio pode ser observado nas primeiras oito horas de liberação e corresponde ao efeito de explosão do sistema, o qual representa cerca de 70 % de fármaco liberado para o meio. Este alto efeito de explosão está associado à alta solubilidade da daunorubicina ( $39,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e sua acumulação nas superfícies das fibras durante o processo de eletrofição, o qual pode resultar difusão rápida do fármaco para a solução, conforme relatado previamente na literatura.

O segundo domínio corresponde ao período de 8 a 624 horas e o terceiro de 624 a 1224 horas. Em cada um destes domínios observa-se uma lenta liberação de fármaco de cerca de 10 % em cada período, totalizando 90 % de fármaco liberado ao final de 1224 horas. Este comportamento pode ser uma consequência de interações não covalentes do fármaco com a

matriz de PLGA, conforme observado e discutido nas análises de Termogravimetria, Calorimetria Exploratória Diferencial e Difração de raios-X. Assim, a daunorubicina pode estar aprisionada na matriz do polímero. Do ponto de vista farmacêutico, uma alta liberação inicial pode promover um grande efeito antitumoral local atuando, assim, como uma dose de ataque às células cancerígenas e eliminando grande parte das mesmas. Posteriormente, uma lenta e controlada liberação de fármaco evitaria o crescimento e proliferação de células que por ventura não teriam sido eliminadas na fase inicial da liberação. Portanto, este novo sistema parece ser uma estratégia clínica promissora, na qual as fibras de PLGA-DNR atuariam como dispositivo local para tratamento de tumores sólidos.

Os mecanismos de liberação de daunorubicina em matriz de fibras de PLGA foram analisados utilizando-se os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell [139], os quais foram apresentados e descritos no Capítulo 4 item 4.3 durante a avaliação da liberação de cloridrato de propranolol em matrizes de PMAA e poliβCD. A Tabela 5.2 apresenta os coeficientes de regressão obtidos na análise dos modelos citados

**Tabela 5.2 - Coeficientes de regressão ( $R^2$ ) obtidos na modelagem da cinética de liberação de daunorubicina em matrizes de fibras de PLGA.**

MODELOS	( $R^2$ ) 8 horas iniciais	( $R^2$ ) 8 a 624 horas	( $R^2$ ) 624 a 1224 horas
Ordem zero	0,8717	0,6869	<b>0,9967</b>
Primeira ordem	0,7789	0,7625	0,8052
Higuchi	<b>0,9457</b>	<b>0,8354</b>	0,9089
Hixon-Crowell	0,7017	0,5507	0,8233

É bem conhecido na literatura que a difusão e o processo de degradação de fibras poliméricas têm um papel importante na cinética de liberação de fármacos. Além disso, alguns trabalhos descreveram a liberação de fármacos a partir de fibras biodegradáveis em etapas distintas, e cada uma pode ser associada a diferentes modelos cinéticos [136, 149, 150].

De fato, pode-se confirmar que a liberação da daunorubicina pode ser modelada por diferentes domínios. O modelo de Higuchi mostrou ser o que melhor se ajusta as primeiras 8 horas de liberação, bem como no período de 8 a 624 horas, uma vez que apresenta os maiores coeficientes de correlação. O modelo de Higuchi assume a difusão baseada nas leis Fick, assim, a porcentagem de fármaco dissolvido varia com a raiz quadrada do tempo, conforme apresentado pela Equação 4.9, na qual que  $k_H$  representa a constante de dissolução de

Higuchi, determinada pela inclinação da curva  $Q(t) \times t^{1/2}$ . O perfil de liberação de daunorubicina no período de 624 a 1224 horas se ajusta de maneira mais aproximada ao modelo de ordem zero, no qual a percentagem cumulativa de fármaco liberado é linear com o tempo, isto é,  $Q = k_0 \times t$ , onde  $k_0$  é a constante de liberação de ordem zero. Este comportamento está relacionado com a degradação das nanofibras de PLGA através da clivagem de ligações éster por hidrólise [131].

### 5.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos, inflamatórios e anti-angiogênicos de fibras poliméricas de cloridrato de daunorubicina em matriz de PLGA

O potencial citotóxico das fibras PLGA-DNR foi avaliado *in vitro* por ensaios de viabilidade celular utilizando o método de metabolização do brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5(difeniltetrazol), MTT. A Figura 5.7 apresenta as porcentagens de viabilidade celular para a DNR livre e incorporada na matriz de PLGA em células tumorais A431 e em células normais de fibroblastos humanos. Uma vez que, o perfil de liberação *in vitro* para as fibras PLGA-DNR demonstrou que 70 % do fármaco é liberado em 48 horas, optou-se por avaliar a citotoxicidade do sistema neste mesmo período. Assim, ambas as células foram incubadas por 48 horas e expostas a diferentes concentrações de fármaco livre e de fibras contendo quantidade equivalente de fármaco.

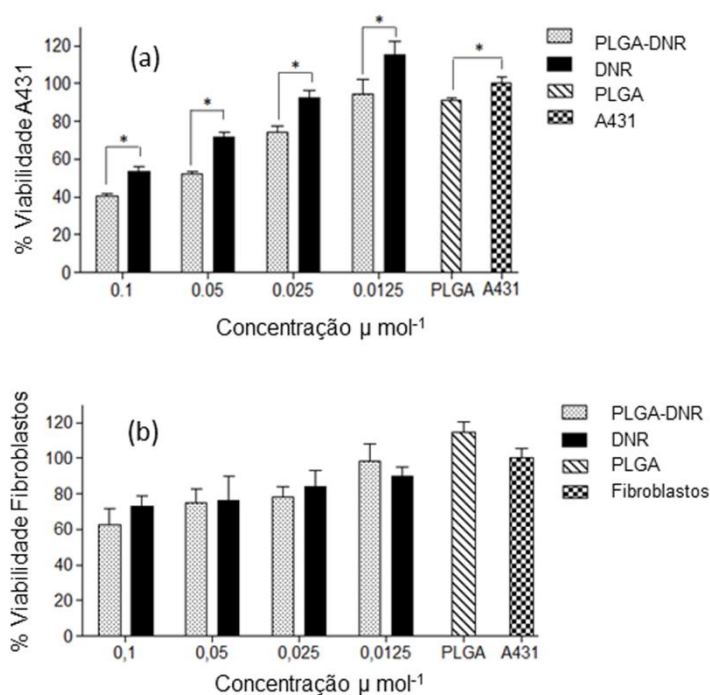


Figura 5.7 - Porcentagem de viabilidade celular para as fibras de PLGA, PLGA-DNR, DNR livre PLGA puro: (a) células tumorais A431 e (b) células normais de fibroblastos humanos.

Analisando os resultados obtidos para as células tumorais A431, pode-se dizer que a citotoxicidade da DNR livre e das fibras PLGA-DNR aumenta de uma maneira dose-dependente, demonstrando que a matriz polimérica não impede a liberação do fármaco. Comparando quantidades equivalentes de fármaco livre e incorporado nas fibras, tem-se que o sistema PLGA-DNR apresenta maior citotoxicidade em todas as concentrações avaliadas (diferença estatisticamente significativa). Este aumento de citotoxicidade da DNR incorporada em fibras de PLGA pode estar associado ao ambiente ácido gerado pela degradação do PLGA, com respectiva produção de ácido lático e glicólico.

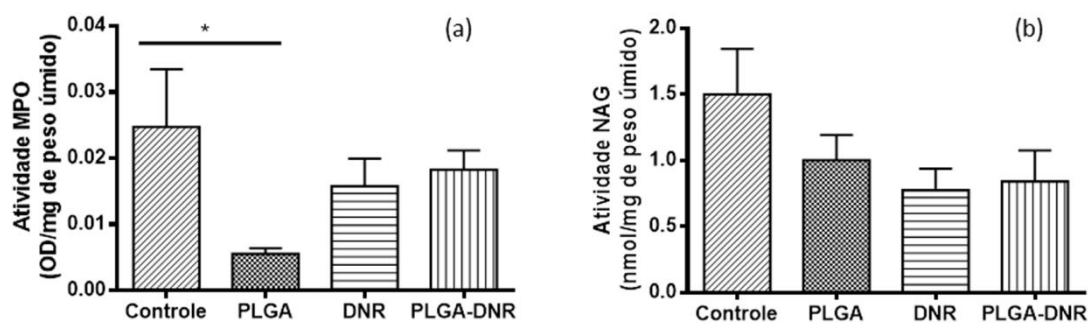
Já é reportado na literatura que fármacos antitumorais fracamente básicos, tais como a DNR, tendem a concentrar-se em regiões mais ácidas, gerando um aumento da citotoxicidade dos mesmos [151]. Resultados semelhantes foram reportados por Jingyuan e colaboradores, (2011) nos quais foram demonstrados que nanofibras de PLA contendo partículas de ouro e DNR (PLA/Au + DNR) são capazes de facilitar a captação do fármaco por células tumorais, aumentando, assim, sua citotoxicidade [152]. Dessa forma, pode-se dizer que as fibras de PLGA-DNR produzidas demonstram ser um sistema que atua de forma mais eficiente contra células A431 do que a DNR livre. Os resultados obtidos para os fibroblastos demonstram uma citotoxicidade similar para a DNR livre e para as fibras PLGA-DNR em todas as concentrações avaliadas.

Os possíveis efeitos inflamatórios dos tecidos fibrovasculares, bem como os efeitos anti-angiogênicos causados pelas fibras de PLGA-DNR foram avaliados *in vivo* após inserção das fibras em discos de poliéter-poliuretano e sequencial implantação em camundongos. Considerando, inicialmente os efeitos inflamatórios, foram monitorados dois marcadores de inflamação. O primeiro foi a N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), a qual é utilizada para detectar o acúmulo e/ou ativação de macrófagos nos tecidos. O segundo marcador foi a mieloperoxidase (MPO) que é considerado um indicador do acúmulo e/ou ativação de neutrófilos. Tumores sólidos causam alterações nos tecido adjacentes, e alguns marcadores podem medir a resposta do organismo ao câncer. É importante mencionar que, diversas evidências conectam o processo inflamatório ao surgimento de doenças neoplásicas [153]. Assim, a determinação dos marcadores de inflamação constitui uma importante estratégia para a avaliação do desenvolvimento do processo canceroso.

A Figura 5.8 apresenta as atividades de MPO e de NAG para as fibras de PLGA, PLGA-DNR, bem como para a DNR livre e para o grupo controle (discos de poliéter-poliuretano). Pode-se perceber que após 7 dias de implantação a atividade de MPO para as fibras de PLGA-DNR, bem como para a DNR livre não foram estatisticamente diferentes quando comparadas

com o grupo controle. Estes resultados indicam que não houve recrutamento/ativação de neutrófilos e conseqüentemente resposta inflamatória aguda. As fibras de PLGA apresentaram a menor atividade de MPO entre todos os grupos avaliados, o que pode ser atribuído à sua alta biocompatibilidade.

Com relação à atividade de NAG para os mesmos grupos mencionados, pode-se dizer que não ocorreram mudanças significativas para as fibras de PLGA-DNR, PLGA e DNR livre quando comparadas ao grupo controle. Tal fato indica que todos os materiais não induziram o recrutamento/ativação de macrófagos e conseqüentemente resposta inflamatória crônica. Os resultados obtidos para as atividades de MOP e NAG indicam que os materiais avaliados são promissores para utilização como sistemas implantáveis para tratamento do câncer.



**Figura 5.8 - Níveis de acumulação de neutrófilos e macrófagos para as fibras de PLGA-DNR, PLGA e DNR livre mensurados através de atividade de: (a) MPO e (b) NAG**

Para avaliar os efeitos de neovascularização dos materiais implantados foi utilizado o método de quantificação de hemoglobina (Hb), bem como a avaliação dos níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). A angiogênese é um processo fundamental e complexo no qual ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes. É reconhecida como elemento chave em diversos eventos fisiológicos e patológicos que envolvem neovascularização, como por exemplo, a embriogênese, cicatrização e crescimento tumoral. Assim, quanto maior for a vascularização, maior a quantidade de sangue no local e, por conseguinte maior a concentração de hemoglobina. O VEGF é um potente estimulador do crescimento de vasos, responsável pela indução da angiogênese em doenças como o câncer [154]. Assim, o monitoramento deste indicador é de fundamental importância e o desenvolvimento de inibidores específicos de VEGF tem proporcionado benefícios substanciais aos pacientes com câncer.

A Figura 5.9 apresenta os níveis de Hb e VEGF para as fibras de PLGA, PLGA-DNR, bem como para a DNR livre e para o grupo controle (discos de poliéter-poliuretano). Pode-se perceber que houve diminuição dos níveis de Hb e VEGF para todos os grupos quando comparados ao controle. Os níveis de Hb são uma medida indireta da formação de novos vasos. Como os mesmos foram reduzidos em relação ao grupo controle, pode-se dizer que houve redução na formação de vasos. Os níveis baixos de VEGF corroboram os resultados para os níveis de Hb, demonstrando que os materiais não induzem a angiogênese.

Estes resultados podem estar associados às dimensões nanométricas das fibras, as quais resultam no aumento da área superficial e da razão de degradação/hidrólise do polímero. Assim, tem-se consequentemente o aumento da liberação de DNR devido a maior exposição ao meio. Dessa forma, pode-se demonstrar a propriedade anti-angiogênica das fibras de PLGA-DNR. Os resultados apresentados estão de acordo com estudos prévios reportados por Iwase e colaboradores e Lee e colaboradores, nos quais são relatados que a daunorubicina é capaz de suprimir a expressão de múltiplos fatores angiogênicos [155, 156].

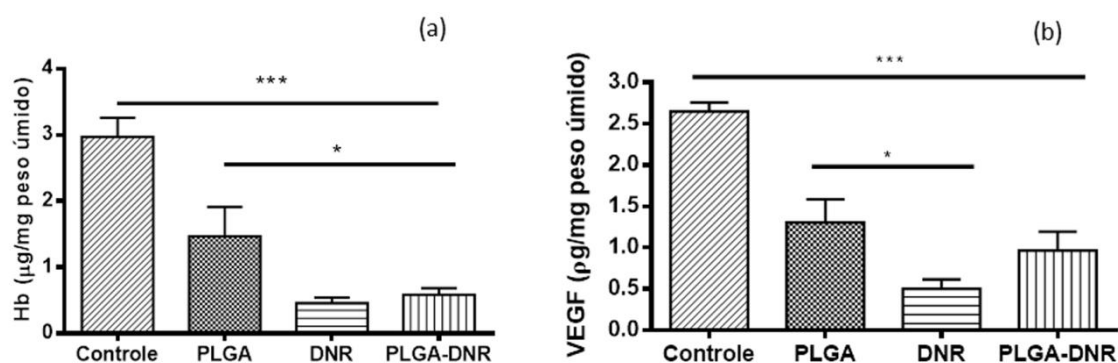


Figura 5.9 - Níveis de acumulação: (a) Hb e (b) VEGF para as fibras de PLGA, PLGA-DNR e DNR livre.

# ***CAPÍTULO 6***

## ***Conclusões***

---

Face aos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que:

**Sistema supramolecular formado por cloridrato de propranolol e  $\beta$ -ciclodextrina**

1. Foi possível confirmar a formação do composto de inclusão entre o cloridrato de propranolol e a  $\beta$ -ciclodextrina em solução, bem como o processo de auto-associação para formação de nanoagregados por técnicas analíticas como ressonância magnética nuclear, calorimetria de titulação isotérmica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e espalhamento de luz dinâmico.
2. Foi possível determinar que o processo de associação é um processo espontâneo com participação entálpica e entrópica e dependente da temperatura.
3. Os coeficientes estequiométricos dos nanoagregados de cloridrato de propranolol: $\beta$ -ciclodextrina aumentam com a elevação da temperatura obtendo-se um sistema de 4:1 (PROP:  $\beta$ CD) a temperatura de 318,15 K.

**Sistemas de liberação de cloridrato de propranolol em matrizes poliméricas**

4. O polímero de  $\beta$ -ciclodextrina (poli $\beta$ CD) foi sintetizado e caracterizado, mostrando-se biocompatível *in vitro*.
5. Foram obtidas de forma inédita nanofibras poliméricas, do tipo uniaxial e coaxial, com matrizes de poli $\beta$ CD e PMAA para a liberação controlada de cloridrato de propranolol. Os arranjos uniaxial e coaxial das nanofibras influenciaram de forma direta a liberação *in vitro* do fármaco. O efeito de explosão foi drasticamente modulado nas fibras coaxiais. Assim, o arranjo coaxial é uma importante estratégia para a liberação de o cloridrato de propranolol, na qual a diminuição do efeito de explosão é necessária para o controle da pressão arterial crônica.

**Sistemas de liberação de cloridrato de daunorubicina em matrizes poliméricas**

6. Foram obtidas e caracterizadas nanofibras poliméricas inéditas em arranjo uniaxial em matrizes de PLGA contendo cloridrato de daunorubicina.
7. Foi observado um significativo efeito de explosão do fármaco presente nas nanofibras, sendo seguido por uma progressiva e lenta liberação.
8. Os testes *in vitro* demonstraram que as nanofibras contendo daunorubicina encapsulada apresentaram maior efeito citotóxico para células tumorais A431 quando comparadas ao fármaco livre.

9. Experimentos *in vivo* revelaram que as nanofibras contendo daunorubicina encapsulada não apresentaram potencial inflamatório mostrando uma diminuição da vascularização da região ao redor do implante.
10. Foi verificado maior efeito anti-angiogênico das nanofibras contendo daunorubicina encapsulada, sendo então, demonstrado seu uso potencial como sistema de liberação para o tratamento *in situ* do câncer e terapia anti-angiogênica.

Como perspectivas futuras para etapas de continuação do presente trabalho serão conduzidos estudos complementares para a caracterização morfológica por criomicroscopia eletrônica dos agregados de cloridrato de propranolol e  $\beta$ CD e estudos teóricos para a determinação de suas estruturas espaciais juntamente com a avaliação dos parâmetros termodinâmicos. Além disso, serão realizados testes biológicos *in vivo* utilizando os referidos agregados e as nanofibras de PMAA e poli $\beta$ CD com o objetivo de monitorar a pressão arterial de camundongos hipertensos. Para as nanofibras contendo cloridrato de daunorubicina, pretende-se realizar novos experimentos *in vivo* para confirmar sua maior citotoxicidade, bem como a redução do volume de tumores sólidos.

Pretende-se ainda obter novos sistemas de liberação de fármacos a base de fibras poliméricas incorporando a estes outros materiais como cerâmicas e materiais magnéticos visando sua aplicação em diagnósticos e tratamento de doenças crônicas, bem como potencializar seu uso clínico incorporando mais de um princípio ativo com o intuito de oferecer terapias de combate complementares.

## ***Referências Bibliográficas***

---

- [1] Geneau R, Stuckler D, Stachenko S, McKee M, Ebrahim S, Basu S, et al. Chronic Diseases: Chronic Diseases and Development 1 Raising the priority of preventing chronic diseases: a political process. *Lancet*. 2010 Nov;376(9753):1689-98.
- [2] Schiffrin EL. Hypertension: treatments, diabetes, and developing regions. *Lancet*. 2012 Aug;380(9841):539-41.
- [3] Laurent S, Schlaich M, Esler M. New drugs, procedures, and devices for hypertension. *Lancet*. 2012 Aug;380(9841):591-600.
- [4] Heidel JD, Davis ME. Clinical Developments in Nanotechnology for Cancer Therapy. *Pharmaceutical Research*. Feb;28(2):187-99.
- [5] Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008 Sep;7(9):771-82.
- [6] Chirra HD, Desai TA. Emerging microtechnologies for the development of oral drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012 Nov;64(14):1569-78.
- [7] Langer R. Where a pill won't reach. *Scientific American*. 2003 Apr;288(4):50-7.
- [8] Arcos D, Vallet-Regi M. Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia*. 2013 Feb;61(3):890-911.
- [9] Chavanpatil MD, Jain P, Chaudhari S, Shear R, Vavia PR. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006 Jun;316(1-2):86-92.
- [10] Chacko RT, Ventura J, Zhuang JM, Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012 Jun;64(9):836-51.
- [11] Szentivanyi A, Chakradeo T, Zernetsch H, Glasmacher B. Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63(4-5):209-20.
- [12] Patel VM, Prajapati BG, Patel MM. Effect of hydrophilic polymers on buccoadhesive Eudragit patches of propranolol hydrochloride using factorial design. *Aaps Pharmscitech*. 2007;8(2).
- [13] Ma P, Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. *Nano Today*. 2013 Jun;8(3):313-31.
- [14] Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013 Jan;65(1):104-20.
- [15] Felice B, Prabhakaran MP, Rodriguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2014 Aug 1;41:178-95.

- [16] Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *Acs Nano*. 2009 Jan;3(1):16-20.
- [17] Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012 Dec;64:302-15.
- [18] Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(3):1147-235.
- [19] Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004 May;39(9):1033-46.
- [20] Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996 Oct;85(10):1017-25.
- [21] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. 1998 Jul-Aug;98(5):1743-53.
- [22] Lehn JM. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chemical Society Reviews*. 2007;36(2):151-60.
- [23] Denadai AML, Teixeira KI, Santoro MM, Pimenta AMC, Cortes ME, Sinisterra RD. Supramolecular self-assembly of beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydrate Research*. 2007 Nov;342(15):2286-96.
- [24] Steed JW, Turner DR, Wallace KJ. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*: John Wiley & Sons, Ltd 2007.
- [25] Al-Soufi W, Reija B, Novo M, Felekyan S, Kuhnemuth R, Seidel CAM. Fluorescence correlation spectroscopy, a tool to investigate supramolecular dynamics: Inclusion complexes of pyronines with cyclodextrin. *Journal of the American Chemical Society*. 2005 Jun;127(24):8775-84.
- [26] De Sousa FB, Lima AC, Denadai AML, Anconi CPA, De Almeida WB, Novato WTG, et al. Superstructure based on beta-CD self-assembly induced by a small guest molecule. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012;14(6):1934-44.
- [27] Carrier RL, Miller LA, Ahmed M. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. 2007 Nov;123(2):78-99.
- [28] Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004 Dec;3(12):1023-35.
- [29] Hirayama F, Uekama K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999 Mar;36(1):125-41.
- [30] Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 Jul;59(7):645-66.

- [31] Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001 Aug;225(1-2):15-30.
- [32] Loftsson T, Masson M, Brewster ME. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004 May;93(5):1091-9.
- [33] Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007 Feb;329(1-2):1-11.
- [34] Duan MS, Zhao N, Ossurardottir IB, Thorsteinsson T, Loftsson T. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: Formation of aggregates and higher-order complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005 Jun;297(1-2):213-22.
- [35] Messner M, Kurkov SV, Flavia-Piera R, Brewster ME, Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrins: The effect of the guest molecule. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Apr;408(1-2):235-47.
- [36] Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 Mar;387(1-2):199-208.
- [37] He YF, Shen XH, Chen QD, Gao HC. Characterization and mechanism study of micrometer-sized secondary assembly of beta-cyclodextrin. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011;13(2):447-52.
- [38] Micali N, Villari V, Mazzaglia A, Scolaro LM, Valerio A, Rencurosi A, et al. Cyclodextrin nanoaggregates and their assembly with protein: a spectroscopic investigation. *Nanotechnology*. 2006 Jul;17(13):3239-44.
- [39] Bai Y, Xu GY, Sun HY, Yang XD, Hao AY, Pang JY, et al. The surface property and aggregation behavior of a hydrophobically modified cyclodextrin. *Colloid and Polymer Science*. 2010 Feb;288(4):415-21.
- [40] Bonini M, Rossi S, Karlsson G, Almgren M, Lo Nostro P, Baglioni P. Self-assembly of beta-cyclodextrin in water. Part 1: Cryo-TEM and dynamic and static light scattering. *Langmuir*. 2006 Feb;22(4):1478-84.
- [41] Messner M, Kurkov SV, Brewster ME, Jansook P, Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrin complexes: Aggregation of hydrocortisone/cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Apr;407(1-2):174-83.
- [42] Gonzalez-Gaitano G, Rodriguez P, Isasi JR, Fuentes M, Tardajos G, Sanchez M. The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2002 Dec;44(1-4):101-5.
- [43] Jansook P, Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins as Solubilizers: Formation of Complex Aggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010 Feb;99(2):719-29.

- [44] Szente L, Szejtli J, Kis GL. Spontaneous opalescence of aqueous gamma-cyclodextrin solutions: Complex formation or self-aggregation? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998 Jun;87(6):778-81.
- [45] Messner M, Kurkov SV, Palazon MM, Fernandez BA, Brewster ME, Loftsson T. Self-assembly of cyclodextrin complexes: Effect of temperature, agitation and media composition on aggregation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Oct;419(1-2):322-8.
- [46] De Sousa FB. Estudo e caracterização físico-química de sistemas supramoleculares nanoagregados e de matrizes poliméricas associadas à ciclodextrina. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
- [47] Hedges AR. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 1998 Jul-Aug;98(5):2035-44.
- [48] Tellini VHS, Jover A, Garcia JC, Galantini L, Meijide F, Tato JV. Thermodynamics of formation of host-guest supramolecular polymers. *Journal of the American Chemical Society*. 2006 May;128(17):5728-34.
- [49] Zhang JX, Ma PX. Host-guest interactions mediated nano-assemblies using cyclodextrin-containing hydrophilic polymers and their biomedical applications. *Nano Today*. 2010 Aug;5(4):337-50.
- [50] Renard E, Deratani A, Volet G, Sebille B. Preparation and characterization of water soluble high molecular weight beta-cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *European Polymer Journal*. 1997 Jan;33(1):49-57.
- [51] Koopmans C, Ritter H. Formation of Physical Hydrogels via Host-Guest Interactions of beta-Cyclodextrin Polymers and Copolymers Bearing Adamantyl Groups. *Macromolecules*. 2008 Oct;41(20):7418-22.
- [52] Velaz I, Isasi JR, Sanchez M, Uzqueda M, Ponchel G. Structural characteristics of some soluble and insoluble beta-cyclodextrin polymers. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2007 Apr;57(1-4):65-8.
- [53] Romo A, Penas FJ, Sevillano X, Isasi JR. Application of factorial experimental design to the study of the suspension polymerization of beta-cyclodextrin and epichlorohydrin. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006 May;100(4):3393-402.
- [54] Burckbuchler V, Wintgens V, Leborgne C, Lecomte S, Leygue N, Scherman D, et al. Development and Characterization of New Cyclodextrin Polymer-Based DNA Delivery Systems. *Bioconjugate Chemistry*. 2008 Dec;19(12):2311-20.
- [55] Cheng JJ, Khin KT, Jensen GS, Liu AJ, Davis ME. Synthesis of linear, beta-cyclodextrin-based polymers and their camptothecin conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. 2003 Sep-Oct;14(5):1007-17.

- [56] Gref R, Amiel C, Molinard K, Daoud-Mahammed S, Sebille B, Gillet B, et al. New self-assembled nanogels based on host-guest interactions: Characterization and drug loading. *Journal of Controlled Release*. 2006 Apr;111(3):316-24.
- [57] Li JS, Xiao HN, Li JH, Zhong YP. Drug carrier systems based on water-soluble cationic beta-cyclodextrin polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004 Jul;278(2):329-42.
- [58] Mura P, Faucci MT, Maestrelli F, Furlanetto S, Pinzauti S. Characterization of physicochemical properties of naproxen systems with amorphous beta-cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002 Aug;29(6):1015-24.
- [59] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004 Apr;428(6982):487-92.
- [60] Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for Drug Delivery Systems. In: Prausnitz JM, Doherty MF, Segalman MA, eds. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, Vol 1* 2010:149-73.
- [61] Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in Biotechnology*. 1999 Oct;17(10):409-21.
- [62] Galaev IY, Mattiasson B. 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends in Biotechnology*. 1999 Aug;17(8):335-40.
- [63] Kim JH, Park K, Nam HY, Lee S, Kim K, Kwon IC. Polymers for bioimaging. *Progress in Polymer Science*. 2007 Aug-Sep;32(8-9):1031-53.
- [64] Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001 Aug;5(4):447-51.
- [65] Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*. 1999 Nov;99(11):3181-98.
- [66] Nampoothiri KM, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010 Nov;101(22):8493-501.
- [67] Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. 2002 Aug;6(4):319-27.
- [68] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2010 Jan;75(1):1-18.
- [69] Seyednejad H, Ghassemi AH, van Nostrum CF, Vermonden T, Hennink WE. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*. 2011 May;152(1):168-76.
- [70] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007 Aug-Sep;32(8-9):762-98.

- [71] Jain R, Shah NH, Malick AW, Rhodes CT. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: Different preparative approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1998;24(8):703-27.
- [72] Kumar M, Kumar N. Polymeric controlled drug-delivery systems: Perspective issues and opportunities. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2001;27(1):1-30.
- [73] Zhang J, Peppas NA. Synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymeric networks. *Macromolecules*. 2000 Jan 11;33(1):102-7.
- [74] Bajpai AK, Shukla SK, Bhanu S, Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 2008 Nov;33(11):1088-118.
- [75] van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007 Aug;24(8):1405-14.
- [76] Joo KI, Xiao L, Liu SL, Liu YR, Lee CL, Conti PS, et al. Crosslinked multilamellar liposomes for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2013 Apr;34(12):3098-109.
- [77] Park J, Mattessich T, Jay SM, Agawu A, Saltzman WM, Fahmy TM. Enhancement of surface ligand display on PLGA nanoparticles with amphiphilic ligand conjugates. *Journal of Controlled Release*. 2011 Nov;156(1):109-15.
- [78] Sill TJ, von Recum HA. Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008 May;29(13):1989-2006.
- [79] Sutton D, Nasongkla N, Blanco E, Gao JM. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007 Jun;24(6):1029-46.
- [80] Thanh NTK, Green LAW. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*. 2010 Jun;5(3):213-30.
- [81] Li L, Hsieh YL. Ultra-fine polyelectrolyte fibers from electrospinning of poly(acrylic acid). *Polymer*. 2005 Jun;46(14):5133-9.
- [82] Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2007;46(30):5670-703.
- [83] Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 Dec 10;59(14):1384-91.
- [84] Lu X, Wang C, Wei Y. One-Dimensional Composite Nanomaterials: Synthesis by Electrospinning and Their Applications. *Small*. 2009 Nov 2;5(21):2349-70.
- [85] Li D, Xia YN. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Advanced Materials*. 2004 Jul 19;16(14):1151-70.
- [86] Zhang D, Chang J. Electrospinning of Three-Dimensional Nanofibrous Tubes with Controllable Architectures. *Nano Letters*. 2008 Oct;8(10):3283-7.

- [87] Rogina A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science*. 2014 Mar 30;296:221-30.
- [88] Zamani M, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*. 2013 2013;8:2997-3017.
- [89] Uyar T, Havelund R, Nur Y, Hacaloglu J, Besenbacher F, Kingshott P. Molecular filters based on cyclodextrin functionalized electrospun fibers. *Journal of Membrane Science*. 2009 Apr 15;332(1-2):129-37.
- [90] Uyar T, Besenbacher F. Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers. *European Polymer Journal*. 2009 Apr;45(4):1032-7.
- [91] Ji W, Sun Y, Yang F, van den Beucken JJP, Fan M, Chen Z, et al. Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications. *Pharmaceutical Research*. 2011 Jun;28(6):1259-72.
- [92] Saenger W. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry *Angewandte Chemie-International Edition in English*. 1980;19(5):344-62.
- [93] Sun L, Stenken JA. The effect of beta-cyclodextrin on liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry analysis of hydrophobic drug molecules. *Journal of Chromatography A*. 2007 Aug;1161(1-2):261-8.
- [94] Ubrich N, Bouillot P, Pellerin C, Hoffman M, Maincent P. Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. *Journal of Controlled Release*. 2004 Jun;97(2):291-300.
- [95] De Sousa FB, Denadai AML, Lula IS, Nascimento CS, Fernandes NSG, Lima AC, et al. Supramolecular self-assembly of cyclodextrin and higher water soluble guest: Thermodynamics and topological studies. *Journal of the American Chemical Society*. 2008 Jul;130(26):8426-36.
- [96] Miller LA, Carrier RL, Ahmed I. Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007 Jul;96(7):1691-707.
- [97] Yu DG, Branford-White CJ, Chatterton NP, White K, Zhu LM, Shen XX, et al. Electrospinning of Concentrated Polymer Solutions. *Macromolecules*. 2010 Dec;43(24):10743-6.
- [98] Schneider HJ, Hacket F, Rudiger V, Ikeda H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews*. 1998 Jul-Aug;98(5):1755-85.
- [99] Zielinska-Pisklak MA, Pisklak DM, Wawer I. H-1 and C-13 NMR characteristics of beta-blockers. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2011 May;49(5):284-90.

- [100] de Paula WX, Denadai AML, Santoro MM, Braga ANG, Santos RAS, Sinisterra RD. Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl-beta-CD: ESI mass-spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry and anti-hypertensive studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Feb;404(1-2):116-23.
- [101] de Sousa FB, Denadai AML, Lula IS, Lopes JF, Dos Santos HF, De Almeida WB, et al. Supramolecular complex of fluoxetine with beta-cyclodextrin: An experimental and theoretical study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008 Apr;353(1-2):160-9.
- [102] Passos JJ, De Sousa FB, Lula IS, Barreto EA, Lopes JF, De Almeida WB, et al. Multi-equilibrium system based on sertraline and beta-cyclodextrin supramolecular complex in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Dec;421(1):24-33.
- [103] Guo XL, Yang Y, Zhao GY, Zhang GM, Chao JB, Shuang SM. Study on inclusion interaction of piroxicam with beta-cyclodextrin derivatives. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2003 Dec;59(14):3379-86.
- [104] Bouchemal K. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discovery Today*. 2008 Nov;13(21-22):960-72.
- [105] Bouchemal K, Mazzaferro S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. *Drug Discovery Today*. 2012 Jun;17(11-12):623-9.
- [106] Shval A, Mastai Y. Isothermal titration calorimetry as a new tool to investigate chiral interactions at crystal surfaces. *Chemical Communications*. 2011;47(20):5735-7.
- [107] Turnbull WB, Daranas AH. On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*. 2003 Dec;125(48):14859-66.
- [108] Passos JJ, De Sousa FB, Mundim IM, Bonfim RR, Melo R, Viana AF, et al. Double continuous injection preparation method of cyclodextrin inclusion compounds by spray drying. *Chemical Engineering Journal*. 2013;228(0):345-51.
- [109] O'Neill MAA, Gaisford S. Application and use of isothermal calorimetry in pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Sep;417(1-2):83-93.
- [110] De Paula EEB, De Sousa FB, Da Silva JCC, Fernandes FR, Melo MN, Frezard F, et al. Insights into the multi-equilibrium, superstructure system based on beta-cyclodextrin and a highly water soluble guest. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012 Dec;439(1-2):207-15.
- [111] Denadai AML, Santoro MM, Texeira AV, Sinisterra RD. New insights regarding the cyclodextrin/AAS self-assembly: A molar ratio dependent system. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2010 Apr;30(3):417-22.

- [112] Jensen CED, dos Santos RAS, Denadai AML, Santos CFF, Braga ANG, Sinisterra RD. Pharmaceutical Composition of Valsartan: beta-Cyclodextrin: Physico-Chemical Characterization and Anti-Hypertensive Evaluation. *Molecules*. 2010 Jun;15(6):4067-84.
- [113] Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 1998 Jul-Aug;98(5):1875-917.
- [114] Martins PS, Ochoa R, Pimenta AMC, Ferreira LAM, Melo AL, da Silva JBB, et al. Mode of action of beta-cyclodextrin as an absorption enhancer of the water-soluble drug meglumine antimoniate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006 Nov;325(1-2):39-47.
- [115] Nebot C, Gibb SW, Boyd KG. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007 Aug;598(1):87-94.
- [116] Nascimento CS, Anconi CPA, Dos Santos HF, De Almeida WB. Theoretical study of the alpha-cyclodextrin dimer. *Journal of Physical Chemistry A*. 2005 Apr;109(14):3209-19.
- [117] Montaudo G, Lattimer RP. *Mass Spectrometry of Polymers*. New York: CRC Press LLC 2002.
- [118] Sun SF. *Physical Chemistry of Macromolecules - Basic Principles and Issues*. Second Edition ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc 2004.
- [119] van de Manakker F, Vermonden T, van Nostrum CF, Hennink WE. Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009 Dec;10(12):3157-75.
- [120] Pouliquen G, Amiel C, Tribet C. Photoresponsive viscosity and host-guest association in aqueous mixtures of poly-cyclodextrin with azobenzene-modified poly(acrylic)acid. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007 May 24;111(20):5587-95.
- [121] Trotta F, Zanetti M, Camino G. Thermal degradation of cyclodextrins. *Polymer Degradation and Stability*. 2000 2000;69(3):373-9.
- [122] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- [123] Polacco G, Cascone MG, Petarca L, Peretti A. Thermal behaviour of poly(methacrylic acid)/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) complexes. *European Polymer Journal*. 2000 Dec;36(12):2541-4.
- [124] Egyed O. Spectroscopic studies on beta-cyclodextrin *Vibrational Spectroscopy*. 1990 Dec;1(2):225-7.
- [125] Bartolomei M, Bertocchi P, Ramusino MC, Santucci N, Valvo L. Physico-chemical characterisation of the modifications I and II of (R,S) propranolol hydrochloride: solubility and

dissolution studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999 Nov;21(2):299-309.

[126] Sousa RG, Prior-Cabanillas A, Quijada-Garrido I, Barrales-Rienda JM. Dependence of copolymer composition, swelling history, and drug concentration on the loading of diltiazem hydrochloride (DIL.HCl) into poly [(N-isopropylacrylamide)-co-(methacrylic acid)] hydrogels and its release behaviour from hydrogel slabs. *Journal of Controlled Release*. 2005 Feb;102(3):595-606.

[127] Ende MTA, Peppas NA. Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels .2. Diffusion and release studies. *Journal of Controlled Release*. 1997 Sep;48(1):47-56.

[128] Blanco-Fuente H, Esteban-Fernandez B, Blanco-Mendez J, Otero-Espinar FJ. Use of beta-cyclodextrins to prevent modifications of the properties of Carbopol hydrogels due to Carbopol-drug interactions. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2002 Jan;50(1):40-6.

[129] Perez-Marcos B, Ford JL, Armstrong DJ, Elliott PNC, Rostron C, Hogan JE. Influence of pH on the release of propranolol hydrochloride from matrices containing hydroxypropylmethylcellulose K4M and carbopol 974. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996 Mar;85(3):330-4.

[130] Xie C, Li X, Luo X, Yang Y, Cui W, Zou J, et al. Release modulation and cytotoxicity of hydroxycamptothecin-loaded electrospun fibers with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inoculations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 May 31;391(1-2):55-64.

[131] Ranganath SH, Wang C-H. Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2996-3003.

[132] Perkin Elmer ATR accessories - An overview [http://shopperkinelmer.com/Content/technicalinfo/tch\\_atraccessoriespdf](http://shopperkinelmer.com/Content/technicalinfo/tch_atraccessoriespdf), acesso em 23 de maio de 2013.

[133] Meinel AJ, Germershaus O, Luhmann T, Merkle HP, Meinel L. Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;81(1):1-13.

[134] Tiwari SK, Tzezana R, Zussman E, Venkatraman SS. Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core-shell fibers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 Jun;392(1-2):209-17.

[135] Wang C, Yan KW, Lin YD, Hsieh PCH. Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release. *Macromolecules*. 2010 Aug;43(15):6389-97.

- [136] Sohrabi A, Shaibani PM, Etayash H, Kaur K, Thundat T. Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)-nylon6 core/shell nanofibers. *Polymer*. 2013 May;54(11):2699-705.
- [137] Silva FP. Síntese e caracterização de hidrogéis de poli[(N-isopropilacrilamida)-co-(ácido metacrílico)] e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
- [138] Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Aug 30;415(1-2):34-52.
- [139] Nitanan T, Akkaramongkolporn P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Panomsuk S, Opanasopit P. Fabrication and evaluation of cationic exchange nanofibers for controlled drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013 Jun 25;450(1-2):345-53.
- [140] Costa P, Manuel J, Lobo S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001 May;13(2):123-33.
- [141] Sofokleous P, Stride E, Edirisinghe M. Preparation, Characterization, and Release of Amoxicillin from Electrospun Fibrous Wound Dressing Patches. *Pharmaceutical Research*. 2013 Jul;30(7):1926-38.
- [142] Martinez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *Journal of Controlled Release*. 2004 Sep 14;99(1):41-52.
- [143] Simeonova M, Ivanova G, Enchev V, Markova N, Kamburov M, Petkov C, et al. Physicochemical characterization and in vitro behavior of daunorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 2009 Jul;5(6):2109-21.
- [144] ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES - FOLEY,K. *Journal of the American Chemical Society*. 1984 1984;106(4):1173-.
- [145] Wei A, Wang J, Wang X, Wei Q, Ge M, Hou D. Preparation and Characterization of the Electrospun Nanofibers Loaded with Clarithromycin. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010 Oct 5;118(1):346-52.
- [146] Demirci S, Celebioglu A, Aytac Z, Uyar T. pH-responsive nanofibers with controlled drug release properties. *Polymer Chemistry*. 2014 2014;5(6):2050-6.
- [147] Fouad H, Elsarnagawy T, Almajhdi FN, Khalil KA. Preparation and In Vitro Thermo-Mechanical Characterization of Electrospun PLGA Nanofibers for Soft and Hard Tissue Replacement. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013 Feb;8(2):2293-304.
- [148] Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 Dec 10;59(14):1392-412.

- [149] Hu X, Liu S, Zhou G, Huang Y, Xie Z, Jing X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. 2014 Jul 10;185:12-21.
- [150] Jannesari M, Varshosaz J, Morshed M, Zamani M. Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine*. 2011 2011;6.
- [151] Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 2003 Oct 1;66(7):1207-18.
- [152] Li J, Chen C, Wang X, Gu Z, Chen B. Novel Strategy to Fabricate PLA/Au Nanocomposites as an Efficient Drug Carrier for Human Leukemia Cells in Vitro. *Nanoscale Research Letters*. 2011 2011;6.
- [153] Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006 Sep;25(3):409-16.
- [154] Duranyildiz D, Camlica H, Soydinc HO, Derin D, Yasasever V. Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remain close to normal. *Breast*. 2009 Feb;18(1):26-9.
- [155] Iwase T, Fu J, Yoshida T, Muramatsu D, Miki A, Hashida N, et al. Sustained delivery of a HIF-1 antagonist for ocular neovascularization. *Journal of Controlled Release*. 2013 Dec 28;172(3):625-33.
- [156] Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Feb 17;106(7):2353-8.

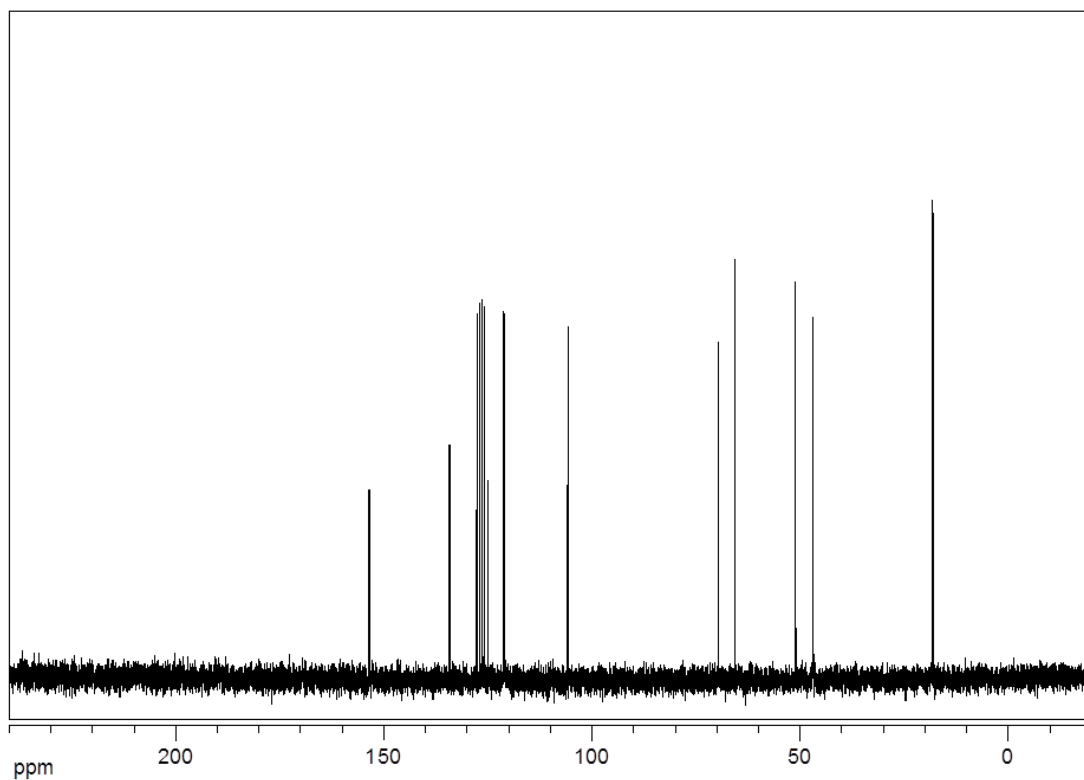
# *Anexo 1*

---

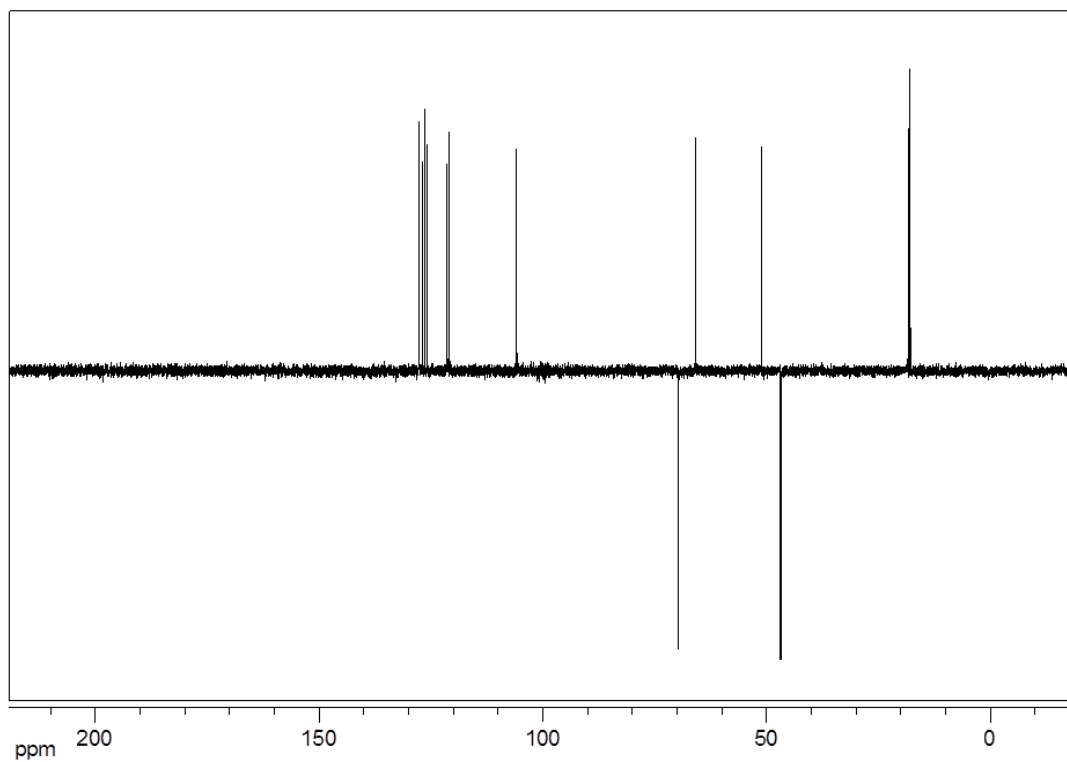
*Espectros de RMN utilizados na caracterização do cloridrato de propranolol*

*Anexo 1: Espectros de RMN utilizados na caracterização do cloridrato de propranolol*

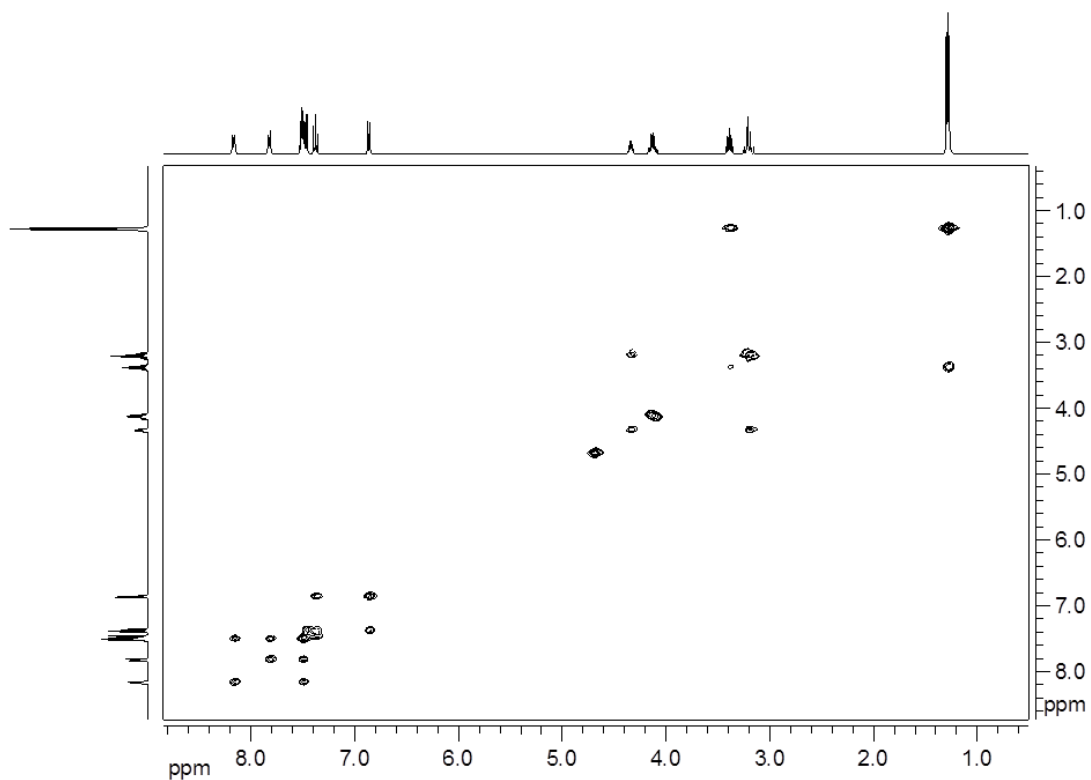
**1. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o cloridrato de propranolol ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).**



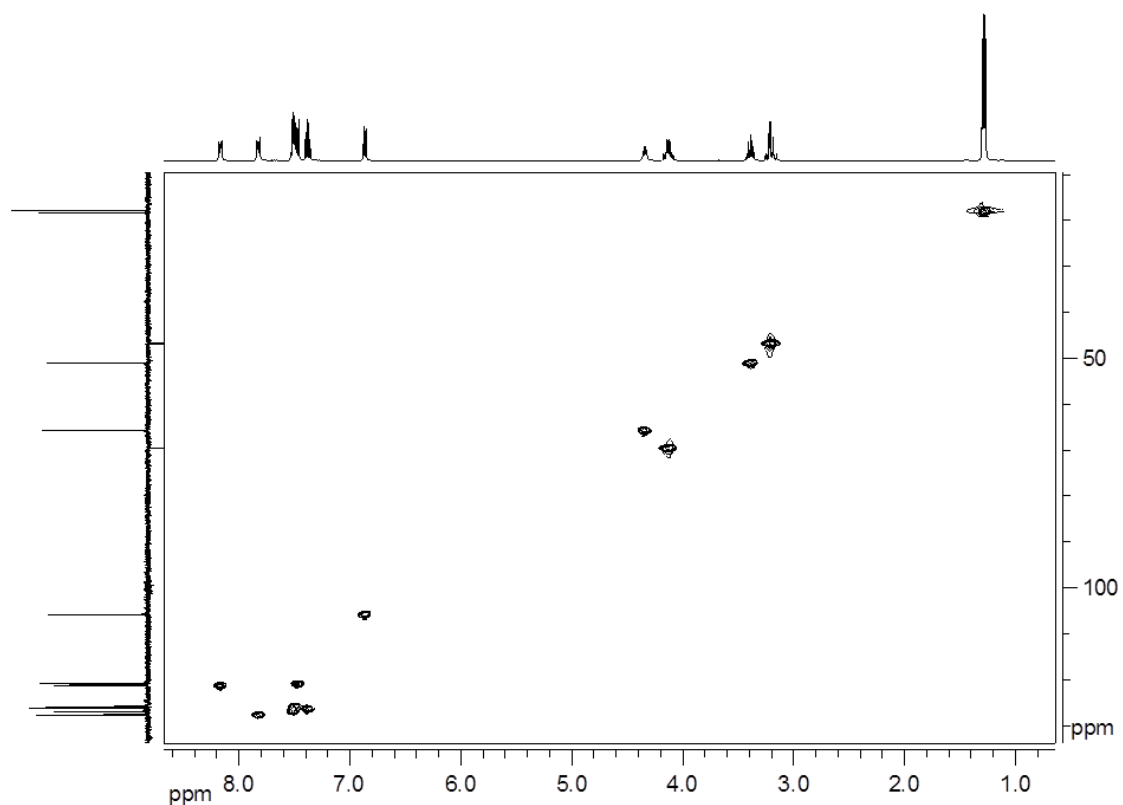
**2. Espectro de RMN DEPT para o cloridrato de propranolol ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).**



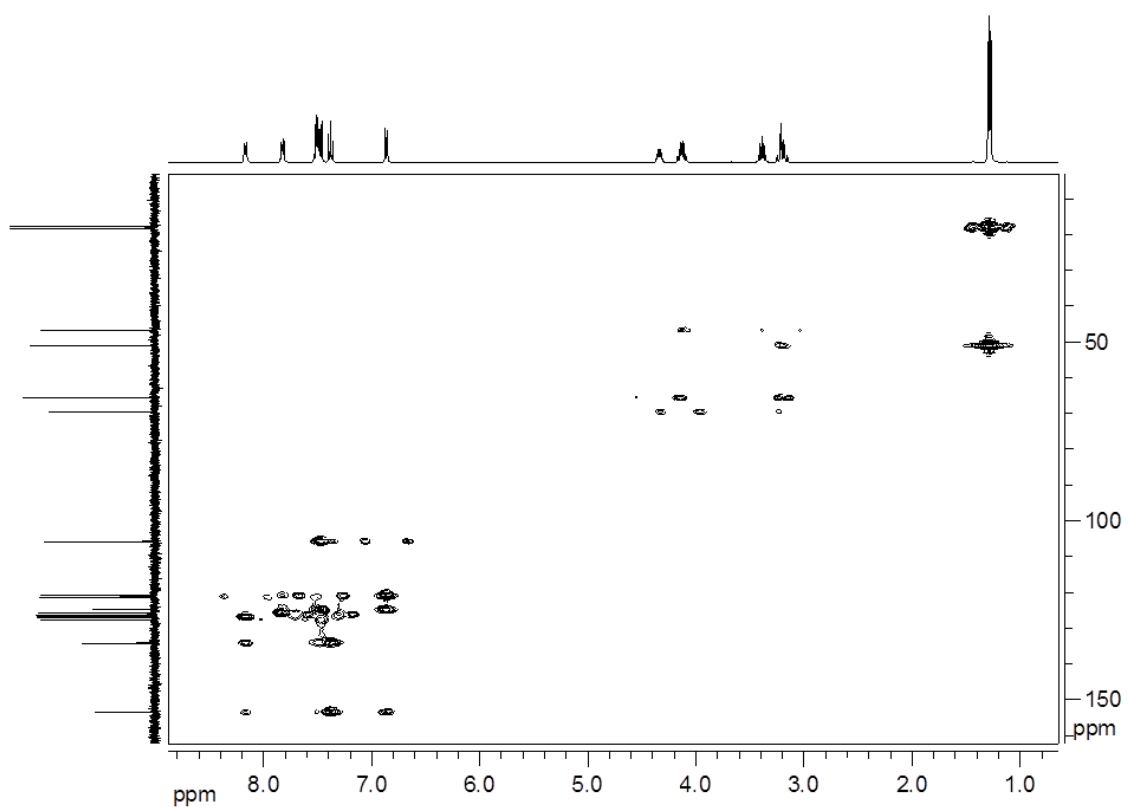
3. Espectro de RMN COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  para o cloridrato de propranolol ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).



4. Espectros de RMN HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  para o cloridrato de propranolol ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).



5. Espectros de RMN HMBC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  para o cloridrato de propranolol ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).



## ***ANEXO 2***

### ***Produção Científica***

---

**1. Artigos publicados em periódicos**

Michele F. Oliveira, Diego Suarez, Júlio César Barbosa Rocha, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Maria E. Cortés, Frederico B. De Sousa, Rubén D. Sinisterra. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. *Materials Science and Engineering C*, vol 54, (2015) 252-261.

Michele F. Oliveira, Pedro P. G. Guimarães, Alinne D. M. Gomes, Diego Suárez, Rubén D. Sinisterra. Strategies to target tumors using nanodelivery systems based on biodegradable polymers, aspects of intellectual property, and Market. *Journal of Chemical Biology* vol 6, (2013) 7-23.

Pedro P. G. Guimarães, Michele F. Oliveira, Alinne D. M. Gomes, Sávio M.L. Gontijo, Maria E. Cortés, Paula P. Campos, Celso T. R. Viana, Silvia P. Andrade, Rubén D. Sinisterra. PLGA nanofibers improves the antitumoral effect of daunorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol 136 (2015) 248–255.

**2. Artigos submetidos e em fase final de redação**

Michele F. Oliveira, Frederico B. De Sousa and Rubén D. Sinisterra. Cyclodextrin-Guest Superstructure in Aqueous Solution Depending on the Temperature. *RSC Advances* (Submitted) 2015.

**3. Trabalhos apresentados em congressos**

Daunorubicin-loaded ultrafine PLGA fibers for cancer drug delivery system. XIII Brazilian MRS Meeting - SBPMat, 2014, João Pessoa, Brasil.

Cyclodextrin polymer-PMAA nanofibers obtained by electrospinning for drug delivery systems . XII Brazilian MRS Meeting - SBPMat, 2013, Campos do Jordão, Brasil.

Sistema polimérico obtido por eletrofiação para liberação de propranolol. V Encontro de Rede Mineira de Química, Diamantina, 2013, Brasil.

Fibras poliméricas obtidas por eletrofiação para aplicação em sistemas de liberação de fármacos. VI Encontro de Rede Mineira de Química, Itajubá, 2013, Brasil.

Caracterização físico-química de nanoagregados de  $\beta$ -ciclodextrina e cloridrato de propranolol. XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Ouro Preto, Brasil.