

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA**

MARIA CECÍLIA RODRIGUES SIMÕES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE
POLIACILHIDRAZONAS E OBTENÇÃO DE FIBRAS
POLIMÉRICAS POR ELETROFIAÇÃO PARA A LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FÁRMACOS**

MARIA CECÍLIA RODRIGUES SIMÕES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE
POLIACILHIDRAZONAS E OBTENÇÃO DE FIBRAS
POLIMÉRICAS POR ELETROFIAÇÃO PARA A LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa

Itajubá, 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família: minha mãe Bernadete por todo amor e dedicação dispensados a mim que me fortaleceram a vida toda; à minha irmã Stella por ser meu exemplo de profissional e de dedicação aos estudos e a meu cunhado Djalma por todo apoio e amizade.

Agradeço ao meu noivo Yuri, por todo amor, cumplicidade e companheirismo: na compreensão de minhas ausências, nas infindáveis ajudas com minhas análises e no amor a mim dado que foram meu sustento para continuar! Ao meu sogro Claudino, minha sogra Ivoneide e meu cunhado Ygor, gratidão pelo apoio!

Agradeço ao meu orientador “Fred” por todo o ensino, auxílio e amizade ao longo desses 4 anos. Mas acima de tudo, por acreditar em mim, em meu trabalho, em minhas ideias e por me mostrar como ser a profissional que busco ser. Bem mais do que apenas um orientador, você se tornou um exemplo: meu muito obrigada! Agradeço também a professora Juliana Fedoce por toda amizade e presença, e ao nosso pequeno Felipe por todos os sorrisos tirados de nós em meio aos nossos dilemas!

Agradeço aos professores: Maurício Santos, Daniela Sachs, Maurício Saraiva por toda ajuda ao longo deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, bem como a UNIFEI por todo auxílio. Ao Instituto Federal do Sul de Minas Gerais pelo aporte financeiro e por minha liberação. À CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo suporte financeiro.

Aos colegas do LSPS e LaQC meu especial obrigada! Meu agradecimento especial à Larissa, Fran, Izadora, Marina, Giovanna, Luiz, Raphael, Chuman, Bonatto e Guilherme por toda a amizade e compartilhamento do saber; e também aos amigos Dijovani e César pelo companheirismo nas longas noites de trabalho!

Ao professor Hernane Barud, agradeço pela oportunidade de conhecer pessoa tão inspiradora que me ajudou a rever ideias, criar caminhos e a encontrar pessoas tão importantes ao longo desse trajeto: agradeço à Dr^a.Andréia Meneguim por suas infindáveis ajudas farmacêuticas e pela amizade; agradeço também à Renata Aquino de Carvalho pela ajuda com os testes de viabilidade celular e por “viabilizar” nossa amizade que será para a vida toda!

Agradeço ao Prof. Dr. Eugen Barbu, pela oportunidade que a mim foi dada de viver a experiência única do doutorado sanduíche. Muito mais que a experiência do trabalho em outro país, pude vivenciar conversas únicas que me formaram como pessoa e profissional. Meu muito obrigada! A colega Anne Juliette, Marta Mele, Miriam Manca, Melina Figueiredo e todos os

colegas da University of Portsmouth, meu obrigada pela amizade ao longo desse período. Às professoras Aikaterini Lalatsa e Marta Roldo meu obrigada pela abertura ao acesso aos equipamentos e laboratórios. A Ana Leao pelo auxílio com as análises de HPLC. A Leanne, minha “housemate” que se tornou amiga, minha eterna gratidão! Meu trabalho não teria sido tão prazeroso sem sua amizade, sua confiança em mim e as horas diárias dispensadas em praticar meu inglês! Gratidão a todos vocês!

Enfim, agradeço a Deus por ser meu sustento diário para completar essa missão. Gratidão pelo dom da vida, pela sabedoria e conselho, e por me ensinar a viver na humildade de ouvir e aprender sempre.

Dedico este trabalho ao meu pai Darcy
Que mesmo ausente me ensinou a dedicação em estudar
e a satisfação em servir ao outro ensinando.
Meu eterno, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIACÕES	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 A QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E OS POLÍMEROS.....	2
1.1.1 Polimetilmetacrilato	4
1.1.2 Policaprolactona	6
1.1.3 Hidrazonas e acilhidrazonas	8
1.2 SISTEMAS POLIMÉRICOS PARA A LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	10
1.3 ELETROFIAÇÃO.....	11
1.3.1 Sistemas coaxiais (core-sheath).....	14
1.3.2 Parâmetros que influenciam o sistema de eletrofiação.....	16
1.4 OBJETIVOS GERAIS	17
1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS: SÍNTESE DE POLIACILHIDRAZONAS E FORMAÇÃO DE FIBRAS POLIMÉRICAS	20
2.1.1 Reação de esterificação: Esterificação de Fischer	20
2.1.2 Reação de hidrazinólise	20
2.1.3 Reações de acoplamento entre hidrazidas e aldeídos	21
2.1.4 Formação de fibras de PMMA 10% (m/v) e poliacilhidrazonas	21
2.1.5 Ensaio de avaliação in vitro do perfil de inibição da inflamação para hidrazidas intermediárias.....	22
2.1.6 Avaliação da citotoxicidade – ensaio de viabilidade celular	22
2.2 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS: FORMAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS DE PMMA E PCL	23

2.2.1	Formação das fibras uniaxiais de PMMA, PCL e suas blends	23
2.2.2	Formação das fibras coaxiais de PMMA e PCL	24
2.3	CARACTERIZAÇÃO DAS POLIACILHIDRAZONAS E INTERMEDIÁRIOS	26
2.4	CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS	26
2.4.1	Caracterização de superfície	27
2.4.2	Caracterização térmica	27
2.4.3	Caracterização mecânica	28
2.4.4	Caracterização in vitro do sistema de liberação- fibras uniaxiais	31
2.4.5	Caracterização in vitro do sistema de liberação formados pelas fibras coaxiais	32
2.4.6	Análise Estatística	33
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO-SÍNTESE	35
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS POLIACILHIDRAZONAS	35
3.1.1	Etapas de formação dos ésteres: reações de esterificação de Fischer	36
3.1.2	Obtenção de hidrazidas: reação de hidrazinólise	46
3.1.3	Formação das poliacilhidrazonas: reação de condensação	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO-FIBRAS UNIAXIAIS	70
4.1	FORMAÇÃO DAS FIBRAS UNIAXIAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO	70
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS UNIAXIAIS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO	71
4.2.1	Caracterização das fibras obtidas por eletrofiação por FTIR-ATR	71
4.2.2	Caracterização térmica das fibras: TG e DSC	73
4.2.3	Caracterização de superfície: microscopia eletrônica de varredura e ângulo de contato	82
4.2.4	Caracterização mecânica das fibras: análise termomecânica –TMA	85
4.2.5	Caracterização mecânica das fibras: ensaio de resistência à ruptura em têturometro	88
4.2.6	Caracterização da propriedade de barreira: permeabilidade ao vapor de água	89
4.3	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FÁRMACO NIMESULIDA	91
4.4	FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DE PMMA E POLIACILHIDRAZONAS	94

4.5	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL CAPACIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS HIDRAZIDAS INTERMEDIÁRIAS	98
4.6	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (ENSAIO DE CITOTOXICIDADE) PARA AS BLENDA DE PMMA/PCL E PARA AS HIDRAZIDAS 4A E 4B.....	100
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-FIBRAS COAXIAIS	103
5.1	FORMAÇÃO DAS FIBRAS COAXIAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO	103
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS OBTIDOS POR ELETROFIAÇÃO	104
5.1.1	Caracterização de superfície das fibras coaxiais: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ângulo de contato	104
5.1.2	Caracterização da propriedade de barreira: permeabilidade ao vapor de água.....	106
5.1.3	Caracterização das fibras coaxiais obtidas por eletrofiação através de FTIR-ATR	107
5.1.4	Caracterização das fibras coaxiais obtidas por eletrofiação através das técnicas de TG e DSC.....	109
5.1.5	Caracterização mecânica das fibras coaxiais: Ensaio de resistência à ruptura em têturometro	111
5.1.6	Caracterização do sistema de liberação in vitro: liberação tipo Franz Cell para o fármaco Nimesulida	112
6	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação da estrutura química de monômeros e seus respectivos polímeros; a) homopolímero b) copolímero	3
Figura 1.2. Representação do monômero metacrilato e o respectivo polímero polimetilmetacrilato (PMMA).....	5
Figura 1.3. Representação do polímero policaprolactona e de seu substrato de origem ϵ -caprolactona.....	6
Figura 1.4. Representação da formação de acilhidrazonas.....	8
Figura 1.5. Representação dos sítios dinâmicos do grupo acilhidrazona: possibilidade de ligações de hidrogênio no grupo amida e ligação imina reversível.....	9
Figura 1.6. Representação dos principais componentes de um sistema de eletrofiação.	12
Figura 1.7. a) Representação das principais forças atuantes na formação do cone de Taylor b) formação do cone de Taylor para a solução de poli(óxido de etileno) a 5 % m/v após diferentes voltagens aplicadas (GREINER; WENDORFF, 2007) c) formação de partículas de PMMA 10% m/v observadas por microscopia óptica d) formação de fusos de PMMA 10 % m/v observados por microscopia óptica e) formação de fibras de PMMA 10% m/v observadas por microscopia óptica.....	14
Figura 1.8. a) Representação esquemática de um sistema de eletrofiação de fibras coaxiais b) Imagem de um cone de Taylor para um processo de eletrofiação coaxial c) Imagem de uma fibra com morfologia <i>core-sheath</i> (Fonte do autor).....	15
Figura 2.1. Equipamento de eletrofiação utilizado na formação dos sistemas <i>core-sheath</i>	25
Figura 2.2. Esquema dos componentes em um ensaio de análise termomecânica	28
Figura 2.3. Imagem de um têturometro Stable Micro System®.....	29
Figura 2.4 Representação do ensaio de permeabilidade ao vapor de água.....	31
Figura 2.5 a) Representação de um sistema de liberação tipo Franz Cell; b) Imagem do sistema Franz Cell utilizado; c) Esquema da montagem do sistema de liberação com as fibras utilizadas.....	33
Figura 3.1 Representação da formação geral das poliacilhidrazonas.....	35
Figura 3.2 Mecanismo da reação de Esterificação de Fischer para a formação dos diésteres..	36
Figura 3.3 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o ácido glutárico 1a	37

Figura 3.4 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o éster glutarato de dimetila 2a	38
Figura 3.5 Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para o éster glutarato de dimetila 2a	38
Figura 3.6 Espectro RMN ^1H em DMSO- d_6 para o éster glutarato de dimetila 2a	39
Figura 3.7 Expansão do espectro RMN ^1H para o éster glutarato de dimetila 2a em DMSO- d_6	40
Figura 3.8 Espectro RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 para o éster dimetilglutarato 2a	40
Figura 3.9 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o ácido isoftálico 1b	41
Figura 3.10 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o éster isoftalato de dimetila 2b	42
Figura 3.11 Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para o éster isoftalato de dimetila 2b	42
Figura 3.12 Espectro RMN ^1H em DMSO- d_6 para o éster isoftalato de dimetila 2b	43
Figura 3.13 Expansão do espectro RMN ^1H para o éster isoftalato de dimetila 2b em DMSO- d_6	44
Figura 3.14 Formas canônicas de ressonância para o éster isoftalato de dimetila 2b	44
Figura 3.15 Espectro RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 para o éster isoftalto de dimetila 2b	45
Figura 3.16 Expansão do espectro RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 para o éster isoftalato de dimetila 2b	46
Figura 3.17 Mecanismo de hidrazinólise para a formação das dihidrazidas.....	47
Figura 3.18 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a glutarohidrazida 3a	47
Figura 3.19 Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para a glutarohidrazida 3a	48
Figura 3.20 Espectro RMN ^1H em DMSO- d_6 para a glutarohidrazida 3a	49
Figura 3.21 Expansão do espectro RMN ^1H para a glutarohidrazida 3a em DMSO- d_6	49
Figura 3.22 Espectro RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 para a glutarohidrazida 3a	50
Figura 3.23 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a isoftalohidrazida 3b	51
Figura 3.24 Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para a isoftalohidrazida 3b	51
Figura 3.25 Espectro RMN ^1H em DMSO- d_6 para a isoftalohidrazida 3b	52
Figura 3.26 Expansão do espectro RMN ^1H para a isoftalohidrazida 3b em DMSO- d_6	53

Figura 3.27 Espectro RMN de ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ para a isoftalohidrazida 3b	54
Figura 3.28. Mecanismo da reação de acoplamento entre dihidrazidas e dialdeídos para formarem aspoliacilhidrazonas.....	55
Figura 3.29. Representação dos possíveis isômeros na subunidade imínica para os polímeros 5A e 5B	56
Figura 3.30 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a poliacilhidrazona 5a	57
Figura 3.31 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o aldeído 4a	57
Figura 3.32 Espectro RMN ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz para a poliacilhidrazona 5A	59
Figura 3.33 Expansão do espectro RMN ^1H para a poliacilhidrazona 5A em $\text{DMSO-}d_6$	59
Figura 3.34 Espectro RMN de ^{13}C para a poliacilhidrazona 5A em $\text{DMSO-}d_6$	61
Figura 3.35 Espectro DEPT-135 para a poliacilhidrazona 5A em $\text{DMSO-}d_6$	61
Figura 3.36 Espectro HSQC $^1\text{H}/\text{DEPT}$ para a poliacilhidrazona 5A em $\text{DMSO-}d_6$	62
Figura 3.37 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a poliacilhidrazona 5B	63
Figura 3.38 Espectro RMN ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz para a poliacilhidrazona 5B	64
Figura 3.39 Expansão do espectro RMN de ^1H para a poliacilhidrazona 5B em $\text{DMSO-}d_6$	64
Figura 3.40 Espectro RMN de ^{13}C para a poliacilhidrazona 5B em $\text{DMSO-}d_6$	65
Figura 3.41 Expansão do espectro RMN de ^{13}C para a poliacilhidrazona 5B em $\text{DMSO-}d_6$	66
Figura 3.42 Espectro DEPT-135 para a poliacilhidrazona 5B em $\text{DMSO-}d_6$	66
Figura 3.43 Espectro HSQC $^1\text{H}/\text{DEPT}$ para a poliacilhidrazona 5B em $\text{DMSO-}d_6$	67
Figura 3.44 Espectro HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a poliacilhidrazona 5B em $\text{DMSO-}d_6$	67
Figura 4.1 Espectros FTIR-ATR na região ampliada de 4000 a 900 cm^{-1} para a) Fibra de PMMA 12% m/v; b) Fibra de PCL 35% m/v; c) Nimesulida; d) Blenda polimérica de PMMA 12% m/v e PCL 12% m/m; e) Blenda polimérica de PMMA 12% m/v e PCL 12% m/m com 30 mg de Nimesulida f) Blenda polimérica de PMMA 12% m/v e PCL 21% m/m com 60 mg de Nimesulida.....	73
Figura 4.2 Análise térmica para PMMA: a) curva TG para PMMA na faixa de 37-600 $^{\circ}\text{C}$ b) curva dTG para PMMA.....	74
Figura 4.3 Proposta de mecanismo de degradação térmica de PMMA (DE PAOLI, 2009).....	75
Figura 4.4 Análise Térmica para a fibra de PCL: a) curva TG para PCL na faixa de 37-600 $^{\circ}\text{C}$; (b) Curva dTG para PCL.....	75
Figura 4.5 Análise Térmica para a Nimesulida: a) curva TG para Nimesulida na faixa de 37-600 $^{\circ}\text{C}$; (b) Curva dTG para Nimesulida.....	76

Figura 4.6 Análise térmica curvas dTG para as blendas de PMMA e PCL sem o fármaco Nimesulida na faixa de 37-600 °C; a) curva dTG para a blenda F3; b) curva dTG para a blenda F4; c) curva dTG para a blenda F5.....	77
Figura 4.7 Análise Térmica curvas dTG para as blendas de PMMA e PCL com o fármaco Nimesulida na faixa de 37-600 °C; a) curva dTG para a blenda F6; b) curva dTG para a blenda F7; c) curva dTG para a blenda F8; d) curva dTG para a blenda F9; e) curva dTG para a blenda F10; f) curva dTG para a blenda F11.....	78
Figura 4.8 Curvas DSC para as fibras e blendas de PMMA e PCL: a) para a fibra de PMMA; b) para a fibra de PCL; c) para a blenda F3 (6% PCL); d) para a blenda F4 (12% PCL); e) para a blenda F5 (21% PCL).....	80
Figura 4.9 Curvas DSC para as blendas de 12% PMMA m/v e quantidades crescentes de PCL na presença do fármaco Nimesulida, a) para a blenda F6; b) para a blenda F7; c) para a blenda F8; d) para a blenda F9; e) para a blenda F10; f) para a blenda F11.....	81
Figura 4.10 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação; a) F1-PMMA; b) F2-PCL; c) F3; d) F4; e) F5; f) F6; g) F7; h) F8; i) F9; j) F10; k) F11- todas com aproximação de 2.000X.....	82
Figura 4.11 Imagens de gotas de água em microfibras: a) PMMA 12% m/v e PCL 6% m/m; b) PMMA 12% m/v e PCL 6% m/m com 30 mg de Nimesulida.....	84
Figura 4.12 Gráficos deformação <i>versus</i> tempo obtidos pela análise de TMA; a) Fibra de PMMA e b) Fibra de PCL.....	85
Figura 4.13 Gráficos deformação <i>versus</i> tempo obtidos pela análise de TMA; a) fibra F3; b) fibra F4 e c) fibra F5.....	86
Figura 4.14 Gráficos deformação <i>versus</i> tempo obtidos pela análise de TMA; a) fibra F6; b) fibra F7 e c) fibra F8.....	87
Figura 4.15 Gráficos deformação <i>versus</i> tempo obtidos pela análise de TMA; a) fibra F9; b) fibra F10 e c) fibra F11.....	87
Figura 4.16 Representação das curvas de calibração para a solução de Nimesulida em tampão PBS pH 7,4 a) em mg/mL; b) micromol/L.....	92
Figura 4.17 Curva de porcentagem de liberação acumulada <i>versus</i> tempo para as fibras F6-F8 no ensaio de liberação <i>in vitro</i> em tampão PBS pH 7,4.....	93
Figura 4.18 Curva de porcentagem de liberação acumulada <i>versus</i> tempo para as fibras F9-F11 no ensaio de liberação <i>in vitro</i> em tampão PBS pH 7,4.....	93
Figura 4.19 Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a fibra de PMMA-5B obtida por eletrofiação; a) aproximação de 540 X e b) aproximação de 2000X.....	95

Figura 4.20 Imagem de gotas de água na superfície das microfibras; a) fibra de PMMA puro; b) fibra de PMMA- 5B	95
Figura 4.21 Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} ; a) espectro de sobreposição para as fibras de PMMA puro, PMMA- 5B e do polímero 5B ; b) espectros isolados para a fibra de PMMA- 5B , PMMA puro e para o polímero 5B	96
Figura 4.22 Análise térmica para a fibra de PMMA- 5B em comparação à PMMA puro e o polímero 5B puro; a) curvas TG na faixa de 37-600 °C; B) curvas dTG de sobreposição.....	97
Figura 4.23 Análise termomecânica deformação <i>versus</i> tempo para a) fibra PMMA puro e b) fibra PMMA- 5B	97
Figura 4.24 Imagem qualitativa do ensaio de inibição da desnaturação proteica de albumina. Lado esquerdo: solução contendo apenas albumina; lado direito: solução contendo albumina e AAS.....	99
Figura 4.25 Gráfico do percentual de inibição de desnaturação para as hidrazidas 3a e 3b em comparação aos fármacos padrão ácido actilsalicílico e nimesulida, todos em concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ com leituras de absorbância realizadas em UV-VIS 660 nm.....	100
Figura 4.26 Gráfico do percentual de viabilidade celular para as fibras de PMMA e PCL puros e blendas dos dois polímeros sem o fármaco Nimesulida e com 30 e 60 mg do fármaco.....	101
Figura 4.27 Gráfico do percentual de viabilidade celular para as hidrazidas 3a e 3b	101
Figura 5.1 a) Imagem fotográfica do Cone de Taylor durante o processo de eletrofiação das fibras <i>core-sheath</i> ; b) microscopia óptica obtida durante o processo de eletrofiação.....	104
Figura 5.2 a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura para a fibra coaxial PMMA-NIM (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>); b) Imagem de microscopia eletrônica de varredura para a fibra coaxial PMMA (<i>core</i>) / PCL-NIM (<i>sheath</i>).	105
Figura 5.3 a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para a fibra coaxial PMMA-NIM (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>) com magnitude de 800X; b) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para a fibra coaxial PMMA (<i>core</i>) / PCL-NIM (<i>sheath</i>) com magnitude de 3000X.	105
Figura 5.4 Espectro FTIR-ATR ampliado na região de 4000 a 900 cm^{-1} ; a) fármaco Nimesulida; b) Fibra de PMMA 12% m/v; c) Fibra de PCL 32% m/v; d) Fibra coaxial PMMA (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>) sem fármaco; e) Fibra coaxial PMMA (<i>core</i>) / PCL/NIM (<i>sheath</i>); f) Fibra coaxial PMMA-NIM (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>).	108
Figura 5.5 Curvas dTG para as fibras na faixa de 37-700 °C; a) Fibra de PMMA 12% m/v; b) Fibra de PCL 32% m/v; c) fármaco Nimesulida; d) Fibra coaxial PMMA (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>)	

sem fármaco; e) Fibra coaxial PMMA (*core*) / PCL/NIM (*sheath*); f) Fibra coaxial PMMA-NIM (*core*) / PCL (*sheath*). 109

Figura 5.6 Termogramas de análise calorimétrica diferencial para: a) Nimesulida; b) Fibra de PCL; c) Fibra coaxial PMMA (*core*) / PCL (*sheath*) sem fármaco; d) Fibra coaxial PMMA-NIM (*core*) / PCL (*sheath*); e) Fibra coaxial PMMA (*core*) / PCL-NIM (*sheath*); f) Fibra de PMMA. Lado esquerdo: expansão para a região característica da T_g de PMMA. Lado direito: expansão para a região característica da T_m de PCL. 110

Figura 5.7 Representação da curva de calibração obtida para a Nimesulida em HPCL sob coluna C8 e fase móvel acetonitrila/ tampão PBS 1:1 112

Figura 5.8 Representação da curva de liberação do fármaco Nimesulida em porcentagem acumulada de liberação *versus* tempo para as fibras coaxiais. 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Parâmetros utilizados no sistema de eletrofiação para a formação das fibras coaxiais.....	25
Tabela 3.1 Contribuição teórica do substituinte acetato em relação ao anel benzênico para prever os deslocamentos químicos dos átomos de carbono de 2b	45
Tabela 4.1 Apresentação das fibras poliméricas formadas a partir de PMMA / PCL e Nimesulida.....	73
Tabela 4.2 Apresentação do diâmetro médio para as fibras poliméricas obtidas por eletrofiação a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura em magnitude de 2000X.....	83
Tabela 4.3 Valores dos ângulos de contato entre as fibras obtidas por eletrofiação e as gotículas de água (média de 10 valores).	84
Tabela 4.4 Valores de Rp e Eb obtidos do ensaio de texturômetro para as fibras obtidas por eletrofiação.....	89
Tabela 4.5. Valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e desvio padrão (DP) para as fibras obtidas por eletrofiação.....	90
Tabela 5.1 Valores dos ângulos de contato médio entre as fibras obtidas e as gotículas de água.....	106
Tabela 5.2 Valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e desvio padrão (DP) para as fibras coaxiais obtidas por eletrofiação.....	107
Tabela 5.3 Valores de Rp e Eb obtidos do ensaio de texturômetro para as fibras coaxiais obtidas por eletrofiação.....	111

LISTA DE ABREVIACÕES

E	- Módulo de Young
Ep	- Energia na perfuração
δ	- Deslocamento Químico
COX	- Ciclooxygenase
COX-2	- Ciclooxygenase-2
DEPT	- <i>Distortioneless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMF	- Dimetilformamida
DMSO _{d6}	- Dimetil sulfóxido deuterado
DSC	- Calorimetria Diferencial Exploratória
dTG	- Termogravimetria derivada
Eb	- Alongamento na ruptura
EM-ES	- Espectrometria de massas por ionização Electrospray
FTIR-ATR	- Espectroscopia na região do infravermelho com reflectância atenuada
HMBC	- Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>Jgem</i>	- Constante de acoplamento geminal
<i>Jorto, meta</i>	- Constante de acoplamento com a posição orto ou meta do anel aromático
<i>Jvic</i>	- Constante de acoplamento vicinal
m/z	- Razão massa/carga (para espectrometria de massas)
MeOH	Metanol
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MHz	- Mega Hertz
PBS	- Tampão fosfato salino (Phosphate buffer saline)
PCL	- Policaprolactona
PMMA	Polimetilmetacrilato
Ppm	- Partes por milhão
PVA	- Permeabilidade ao vapor de D'água
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear

Rp	- Resistência à perfuração
SLC	- Sistemas de liberação controlada
Tg	- Temperatura de transição vítrea
TG	- Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
Tm	- Temperatura de fusão
TMA	- Análise Termomecânica
TMS	- Trimetilsilano
UV	- Espectrofotometria na região Ultravioleta-visível
v_{sim} , v_{ass}	- Estiramento simétrico e assimétrico
σ_{sim} , σ_{ass}	- Deformação angular simétrica e assimétrica

RESUMO

Moléculas com derivados nitrogenados são muito relatadas na literatura devido ao grande potencial biológico previsto para esses grupos de derivados. Dentre os padrões moleculares mais citados, estão as hidrazidas, acilhidrazonas e recentemente os polímeros de acilhidrazonas, designadas “poliacilhidrazonas”. Neste trabalho foram sintetizadas e caracterizadas poliacilhidrazonas a partir da condensação de dialdeídos e dihidrazidas. As mesmas, puderam ser associadas à polímeros comerciais como polimetilmetacrilato para a formação de fibras poliméricas obtidas pela técnica de eletrospinning. Estas fibras foram estudadas quanto a sua morfologia, suas propriedades térmicas e mecânicas, que forneceram importantes informações sobre estes sistemas, como a proteção à degradação fornecida pela acilhidrazona às fibras de polimetilmetacrilato. Devido à baixa solubilidade dos polímeros de hidrazonas propostos, apenas seus intermediários dihidrazidas foram estudados quanto à citotoxicidade e avaliação *in vitro* da atividade antiinflamatória, fornecendo resultados promissores. Em uma via paralela, fibras do polímero policaprolactona são muito úteis em diversas aplicações biológicas devido a suas propriedades mecânicas elevadas, mas devido a sua longa degradação seu uso em sistemas de liberação controlada é restrito. Em contrapartida, fibras de polimetilmetacrilato não oferecem grande resistência mecânica sendo mais utilizadas na forma de blendas com outros polímeros ou através da adição de compósitos. Deste modo neste trabalho foi realizada a formação de blendas entre polimetilmetacrilato e policaprolactona na forma de fibras monoaxiais e também a formação de fibras coaxiais destes mesmos polímeros via o processo de eletrospinning. Estas fibras foram exploradas através da análise morfológica, superficial e térmica para propor o uso destes sistemas na liberação de fármacos hidrofóbicos, como Nimesulida. Os resultados anteriormente citados bem como a análise da citotoxicidade e o ensaio de liberação *in vitro* para o fármaco Nimesulida demonstrou que as fibras propostas exibem potencial para essa atuação.

Palavras-chave: Polimetilmetacrilato, policaprolactona, poliacilhidrazonas, nimesulida, eletrospinning, sistemas de liberação de fármacos.

ABSTRACT

Molecules with nitrogen derivatives are widely reported in the literature due to the great biological potential predicted for these groups. Among the most cited molecular patterns are hydrazides, acylhydrazones and recently polymers of acylhydrazones called “polyacylhydrazones”, are cited too. Polycylhydrazones were synthesized and characterized from the condensation of dialdehydes and dihydrazides. This polyacylhydrazones could be associated with commercial polymers such as polymethylmethacrylate for the formation of polymeric fibers obtained by electrospinning technique. The morphological, thermal and mechanical properties of these fibers were studied, which provided important information about these systems as the protection of degradation provided by acylhydrazone to the polymethylmethacrylate fibers. Due to the low solubility of the proposed hydrazone polymers, only their dihydrazide intermediates have been studied for cytotoxicity and *in vitro* evaluation of antiinflammatory activity, providing promising results. In the other hand, polycaprolactone polymer fibers are very useful in various biological applications due their high mechanical properties, but because of their long degradation the use in controlled release systems is restricted. In contrast, polymethylmethacrylate fibers do not offer higher mechanical strength and are more used to form blends with other polymers or through the addition of composites. Thus, in this work the formation of blends between polymethylmethacrylate and polycaprolactone to generate monoaxial fibers or coaxial ones made by the same polymers was carried out using electrospinning process. These fibers were investigated through morphological, superficial and thermal analysis to propose the use of these systems in the release of hydrophobic drugs, for example Nimesulide. The above results as well as the cytotoxicity analysis and the *in vitro* release assay for the drug Nimesulide demonstrated that the proposed fibers exhibit potential for this action.

Keywords: polymethylmethacrilate, polycaprolactone, polyacylhydrazones, nimesulide, electrospinning, systems of drug delivery.

CÁPITULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 A QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E OS POLÍMEROS

A química supramolecular, além das ligações covalentes estudadas na química molecular (LEHN, 2007) (ONO; NOBORI; LEHN, 2005) (LEHN, 2005) também tem estudado o reconhecimento e a formação de sistemas multicomponentes altamente específicos mantidos por interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo, dentre outras), que são responsáveis pela arquitetura de moléculas e agregados com grande potencial na química de materiais (LEHN, 2002) (ONO *et al.*, 2007) (LEHN, 2001). Estes sistemas, podem sofrer processos de auto-organização ou até troca de seus componentes ou monômeros devido às interações intermoleculares que os regem (não ligações químicas covalentes, por exemplo) gerando uma ampla variedade de compostos supramoleculares através de reorganizações ou troca de blocos de construção (LEHN, 2013) e por isso a química supramolecular também é estabelecida com uma química dinâmica (LEHN, 2001).

Materiais supramoleculares como glicodendrimeros, ciclodextrinas, glicoproteínas ou os polímeros (MICALI *et al.*, 2006), são amplamente utilizados e conhecidos em diversas aplicações, dentre elas na formação de sistemas carregadores de fármacos ativos ou no estudo da possível atividade biológica destes materiais (KANJICKAL; LOPINA, 2004) (SCHMIDT *et al.*, 2013). Dentre a classe de materiais supramoleculares, os polímeros estão dentre os mais estudados, devido ao fato de serem macromoléculas unidas por ligações covalentes, mas também regidos por interações intra e intermoleculares que geram propriedades importantes e passíveis de uma ampla variedade de estudos (MANO; MENDES, 1999).

Os polímeros (do grego *poly* “muitas” e *meros* “partes”) (EBELEWE, 2000) são assim denominados por serem obtidos da repetição química de um padrão estrutural iniciador, conhecido como monômero que deve apresentar a possibilidade de crescimento da cadeia. Os polímeros podem ser formados por combinação entre monômeros do mesmo tipo (gerando homopolímeros) ou por combinação de mais de um tipo de monômero gerando os copolímeros. O poliestireno, Figura 1 (a) é um exemplo de homopolímero formado apenas por monômeros de estireno; já o poliestireno-co-poliacetonitrila, Figura 1(b), é um exemplo de copolímero uma vez que é produzido a partir de dois monômeros distintos: n unidades de polietileno e m unidades de poliacetonitrila (EBELEWE, 2000) (MORAWETZ, 1985). Estes polímeros podem ser formados por diversos processos de preparação que são agrupados em abertura de anel,

poliadições ou policondensações, e podem apresentar características distintas como o tipo de reação, o mecanismo envolvido, a velocidade no crescimento da cadeia, o tipo de cadeia formada e a formação de subprodutos (MANO; MENDES, 1999) (MORAWETZ, 1985).

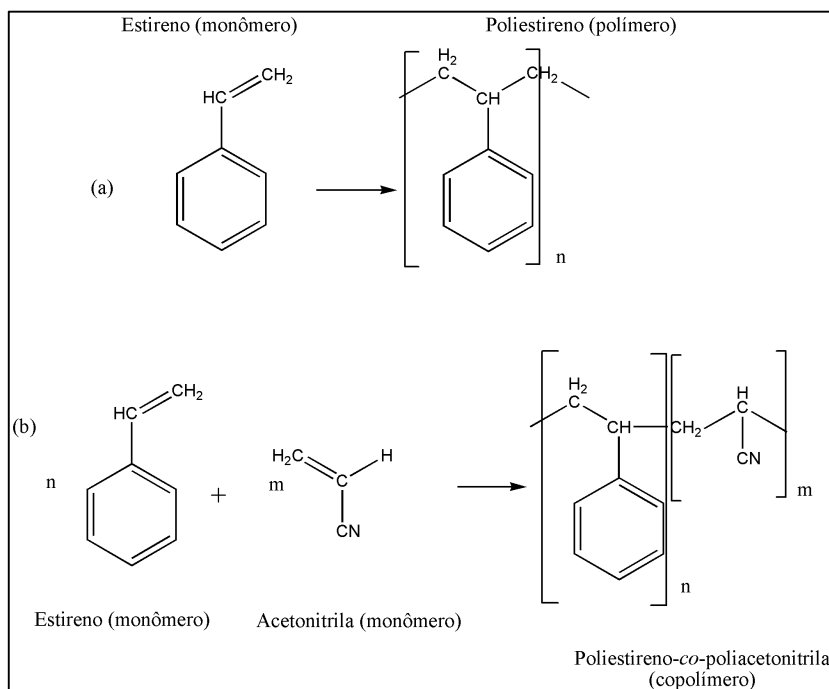


Figura 1.1. Representação da estrutura química de monômeros e seus respectivos polímeros; a) homopolímero
b) copolímero.

Nos processos de poliadição três reações são esperadas sucessivamente, chamadas de iniciação, propagação e terminação. O processo de poliadição envolve um rearranjo eletrônico e a cadeia normalmente é composta apenas por átomos de carbono unidos covalentemente na formação de polímeros como exemplo polietileno, poliestireno ou polimetilmetacrilato. Este processo resulta na formação de polímeros com alta massa molecular (na ordem de 10^5 g/mol) e as reações são mais rápidas e dependentes da formação de espécies químicas reativas na etapa de iniciação como radicais, íons ou sítios de formação de complexos de coordenação.

Nos processos de policondensação, diferentemente, os polímeros apresentam em sua cadeia diferentes átomos oriundos dos grupos funcionais formadores dos monômeros como oxigênio, nitrogênio ou enxofre, como acontece no polioximetileno ou policaprolactama. As reações são mais lentas, porém a conversão dos monômeros em produtos é alta e o peso molecular obtido para os polímeros é menor que nos processos de adição, na ordem de 10^4 g/mol. Em geral não ocorre formação de subprodutos nas reações de poliadição, pois estas apresentam durante toda a reação espécies que reagem rapidamente e levam ao crescimento de grandes cadeias poliméricas, misturadas com monômeros que não reagiram e podem ser

facilmente separados das cadeias poliméricas devido a diferença observada em sua massa molecular. Já nas reações de policondensação pode ocorrer a formação de subprodutos (moléculas como H_2O , HCl ou NH_3) ou até mesmo monômeros residuais que não reagiram e o crescimento da cadeia polimérica é dependente da remoção destes resíduos. Como ao longo da reação a solução tende a aumentar sua viscosidade ou iniciar um processo de precipitação, muitas vezes é difícil a remoção dos subprodutos e o tamanho da cadeia polimérica se torna limitado, levando a polímeros de massas moleculares menores que os encontrados nos processos de adição (MANO; MENDES, 1999) (EBELEWE, 2000) (MORAWETZ, 1985).

Os materiais poliméricos podem ser subdivididos, quanto à degradação, em polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis (NGWULUKA, 2010). Os polímeros biodegradáveis são assim considerados por serem degradados e absorvidos pelo próprio corpo antes de sua eliminação. São assim considerados o polímero natural quitosana e os sintéticos como poliésteres, polianidridos ou poliamidas. Já os não biodegradáveis incluem a celulose e polímeros acrílicos que não se degradam com facilidade no organismo sendo eliminados sem que ocorra a sua absorção (CHANDY; SHARMA, 1993) (LIN, HONG-RU *et al.*, 2010). Contudo os dois tipos de materiais poliméricos são relatados na literatura, dentre outras diversas atividades, como carregadores de substâncias bioativas ou na liberação controlada de fármacos comerciais (WANG, Q. *et al.*, 2011), podendo se apresentar na forma de fibras, nanopartículas, filmes, nanoesferas dentre outras (NGWULUKA, 2010) e resultando por exemplo, no prolongamento da administração terapêutica de um fármaco bem como na modulação da taxa de liberação deste sob condições controladas (KANJICKAL; LOPINA, 2004) (LEHN, 2001).

1.1.1 Polimetilmetacrilato

O polimetilmetacrilato (PMMA) também denominado poli[(1-metóxicarbonil)-1-metil etileno] é um polímero sintético oriundo do monômero metacrilato de metila (Figura 1.2) por reação de poliadição. Foi descoberto em 1930 pelos químicos Rowland Will e John Crawford. O PMMA é um polímero amorfo, opticamente transparente (elevada transparência de seus filmes) e termoplástico, muito utilizado como substituinte de vidros inorgânicos. Apresenta moderada resistência ao impacto e condições favoráveis de processamento que fazem muito amplas suas aplicações desde a indústria de papéis, letreiros, vidraças, até sua aplicação em fibras ópticas (MANO; MENDES, 1999) (ALI, U.; KARIM; BUANG, 2015).

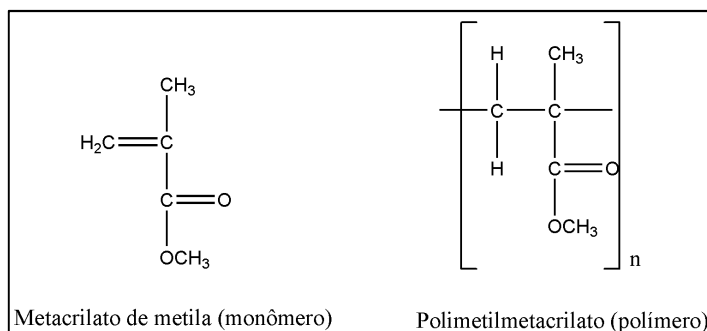


Figura 1.2. Representação do monômero metacrilato e o respectivo polímero polimetilmetacrilato (PMMA).

O PMMA se apresenta na forma amorfa, ou seja, com grau de cristalinidade inferior a 25%, e apresenta temperatura de transição vítrea (T_g , como a temperatura a partir da qual regiões amorfas adquirem progressivamente sua mobilidade) no intervalo de 100 - 130 °C. A rotação limitada para a cadeia do polímero PMMA ocorre devido ao grupo O-CH₃ presente na cadeia polimérica que permite que este polímero se apresente, à temperatura ambiente, abaixo do seu valor de transição vítrea, por não conseguir vencer a barreira de energia rotacional imposta pelo grupo O-CH₃, tornando-o um pouco mais rígido e com maior valor de T_g . Um comparativo deste efeito pode ser avaliado no polímero polibutylmetacrilato que apresenta maior rotação livre na cadeia alifática e menor valor de T_g de aproximadamente 20 °C (MANO; MENDES, 1999) (MORAWETZ, 1985).

Analisando as propriedades físicas e químicas de PMMA este apresenta solubilidade nos solventes como tricloroetileno, acetato de etila, dimetilformamida ou tetrahidrofurano e sua solubilidade depende também do grau de intumescimento do polímero que inicia com a absorção do solvente provocando o intumescimento, seguido da formação de uma camada de solvente na sua superfície que é então seguida da difusão para todo o polímero. Esta é a razão porque PMMA necessita de um tempo antes de ser dissolvido completamente, mesmo que ele se encontre disperso no solvente que apresenta maior solubilidade. O PMMA é um polímero termoplástico (se funde sob aquecimento e solidifica por resfriamento) que apresenta resistência a temperaturas elevadas, apresentando uma temperatura de fusão (T_m) na faixa de 220 - 240 °C. Em sua decomposição térmica, o polímero passa por três fases distintas sendo elas: a) a despolimerização da cadeia polimérica; b) a decomposição do monômero metacrilato de metila em subprodutos voláteis como metano, metanol ou formaldeído e c) combustão dos produtos gasosos gerando CO₂, H₂O ou CO. As faixas para estes eventos de decomposição ocorrem em 220 - 300 °C.

PMMA tem sido utilizado em diversas aplicações, como na área médica para a construção de matrizes ósseas, para sistemas de liberação de medicamentos ou na preparação de compósitos para cranioplastia, por exemplo. Estas aplicações se dão devido à alta biocompatibilidade do PMMA, baixa toxicidade e baixo número de reações inflamatórias com tecidos, além da alta resistência mecânica à fratura quando usado na substituição óssea (ALI, U.; KARIM; BUANG, 2015).

Outra aplicação é a formação de nanofibras de PMMA obtidas pela técnica de eletrofiação para formação de sistemas com potencial aplicação em óptica, sensores, na área de curativos, produção de arcabouços ou na liberação controlada de fármacos (GUPTA *et al.*, 2005). Existem relatos na literatura que a formação de nanofibras por eletrofiação de PMMA leva a obtenção de fibras finas e com baixa resistência mecânica, sendo esta uma desvantagem do uso deste polímero sob essa forma de apresentação (WU *et al.*, 2012) (GRABBERT *et al.*, 2014). Do mesmo modo é relatado que a formação de blendas com polimetilmetacrilato (KIM *et al.*, 2014) (LIU; KUMAR, 2005) (ERBAS *et al.*, 2015), ou a formação de estruturas de PMMA modificadas (BANERJEE *et al.*, 2014) e ainda a adição de compósitos à matriz de PMMA como nanocristais de celulose (DONG *et al.*, 2012) podem atuar como reforços nas propriedades mecânicas deste material para favorecer suas aplicações em diversas áreas.

1.1.2 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) foi primeiramente sintetizada por Carothers e colaboradores na década de 30 e apresenta vários métodos de preparo, sendo o mais usual via polimerização por abertura do anel da ϵ -caprolactona utilizando uma ampla gama de catalisadores (GHAVIMI *et al.*, 2014) (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

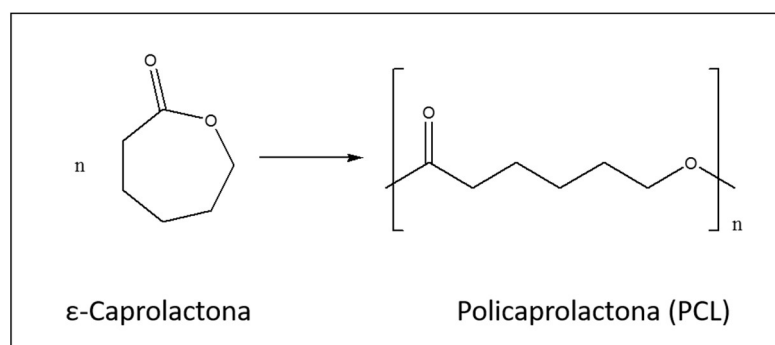


Figura 1.3. Representação do polímero policaprolactona e de seu substrato de origem ϵ -caprolactona.

PCL é um polímero altamente hidrofóbico, semicristalino (grau de cristalinidade em torno de 69 %) e biocompatível. Dentre as diversas aplicações para a policaprolatona, pode-se citar seu uso em próteses cardiovasculares (CICHA *et al.*, 2016), regeneração tecidual (CARAMELLA *et al.*, 2015), regeneração óssea (JEON; ELISSEEFF, 2016) e a liberação controlada de fármacos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010) (MONDAL; GRIFFITH; VENKATRAMAN, 2016).

As propriedades mecânicas e térmicas do PCL são dependentes da massa molecular do polímero e do grau de cristalinidade. Em relação às propriedades físicas e químicas em baixas temperaturas, o PCL mostra-se solúvel em clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e dimetilformamida e apresenta uma propriedade importante de ser miscível com um grande número de polímeros usuais, como policarbonatos ou nitrocelulose. Além disso, se mostra mecanicamente compatível ao ser inserido em matrizes contendo polímeros como polivinilacetato e polietileno (MCNEIL; GRIFFITHS; PERRIE, 2011) (LABET; THIELEMANS, 2009).

A temperatura de transição vítrea para PCL se encontra na faixa de -60 a -65 °C e sua temperatura de fusão T_m se apresenta na faixa de 56 a 65 °C (CARAMELLA *et al.*, 2015) (LABET; THIELEMANS, 2009).

Quanto à sua degradação, esta é extremamente lenta, variando entre meses ou anos, dependendo da massa molecular do polímero. A fase amorfa é degradada primeiro resultando assim em um aumento da cristalinidade enquanto a massa molecular permanece constante; em seguida, a cisão aleatória da cadeia polimérica nos grupamentos ésteres leva a redução do peso molecular. A degradação é auto catalisada por ácidos carboxílicos liberados durante o processo de hidrólise, mas pode ser catalisada também por enzimas resultando em uma decomposição mais rápida (LABET; THIELEMANS, 2009) (GHAVIMI *et al.*, 2014). Sua degradação é comparada a de outros polímeros convencionais biocompatíveis porém com um tempo maior para degradação atingindo cerca de 1 ano, podendo ser formadas blendas com outros materiais poliméricos que facilitem este processo (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010) (JOSHI *et al.*, 2015).

Devido à suas propriedades mecânicas elevadas, o PCL pode apresentar-se sob diversas formas físicas como partículas, filmes ou fibras poliméricas (LABET; THIELEMANS, 2009). Na produção de biomateriais um esforço crescente tem sido realizado na produção de fibras poliméricas obtidas por eletrofiação a partir de PCL. Estes sistemas apresentam vantagens como: o tamanho reduzido das fibras (na ordem de micrômetros a nanômetros) que geram uma vasta superfície de contato destes sistemas com a área de estudo; possibilidade de

geração de propriedades físicas modificadas como adesão ou a porosidade; produção de materiais sem defeitos estruturais, fatores que ajudam a tornar melhores as propriedades mecânicas do material (SUWANTONG, O., 2016).

1.1.3 Hidrazonas e acilhidrazonas

As reações de formação de acilhidrazonas por condensação de hidrazidas com grupos carbonílicos (aldeídos ou cetonas) é amplamente descrita na literatura, devido ao potencial biológico amplamente relatado para essas substâncias (LEHN, 2005), dentre elas as atividades anti-inflamatória, antitrombótica, antileishmania e antiviral (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007) (CUNHA *et al.*, 2003) (DUARTE *et al.*, 2007) (TRIBUTINO *et al.*, 2009) (MASSARICO SERAFIM *et al.*, 2014) (BURGESON *et al.*, 2013). A análise da atividade anti-inflamatória para estas substâncias, sugere que o grupo acilhidrazona é um importante grupo farmacofórico responsável pela inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), especificadamente para sua isoforma 2 (COX-2), sendo então amplamente estudados na ação como anti-inflamatórios não estereoidais (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007) (DE MELO *et al.*, 2014) (BARREIRO *et al.*, 2002) (NARANG; NARASIMHAN; SHARMA, 2012).

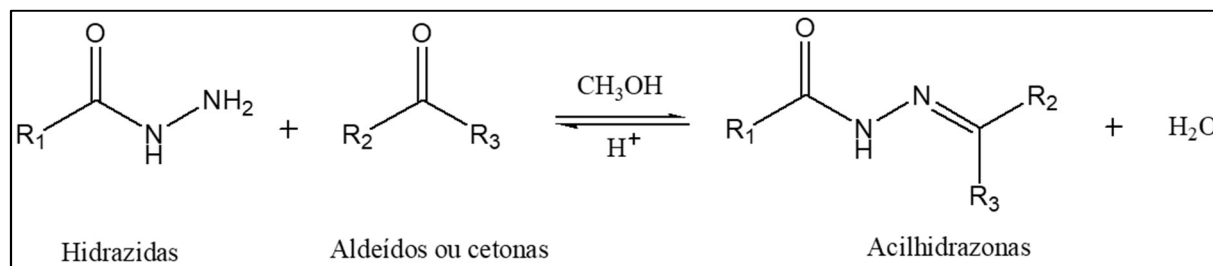


Figura 1.4. Representação da formação de acilhidrazonas.

Acilhidrazonas formadas a partir de dihidrazidas e dicetonas ou dialdeídos podem sofrer reações de polimerização por condensação e gerar poliacilhidrazonas. As poliacilhidrazonas são relatadas na literatura como polímeros covalentes dinâmicos. No ano de 1987, Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn e Charles J. Pedersen receberam o prêmio Nobel em Química por suas importantes contribuições nos trabalhos de reconhecimento molecular na área de química supramolecular (SKENE; LEHN, 2004) (ONO *et al.*, 2007).

Os polímeros covalentes dinâmicos, além das propriedades convencionais de polímeros como resistência e estabilidade, constituem sistemas de natureza molecular e supramolecular que podem ser submetidos à troca, incorporação ou decorporação de suas unidades monoméricas ligadas entre si por ligações covalentes, reversíveis ou lábeis (ONO *et al.*, 2007). Diversos polímeros covalentes dinâmicos têm sido relatados na literatura, (YU *et al.*, 2016)

(OH; JEONG; MOORE, 2003) (HIRSCH; BUHLER; LEHN, 2012) pois seu estudo apresenta uma abrangência na área de novos biomateriais e suas diversas aplicações.

Os principais fatores que alteram a estrutura de polímeros dinâmicos são o ambiente reacional (solventes ou pH do meio reacional), fatores físicos (temperatura, luz ou tensão mecânica) ou fatores químicos como exemplo reações químicas reversíveis na produção do polímero (JIN *et al.*, 2013). A formação de poliacilhidrazonas está inserida no estudo de polímeros covalentes dinâmicos, uma vez que essas estruturas fornecem reversibilidade na subunidade imina ($C=N$), além de fornecer sítios de ligação para formação de ligações de hidrogênio (Figura 1.5). Estes polímeros são especialmente atraentes na química supramolecular pois são copolímeros alternados, formados em condições moderadas e com bons rendimentos além de serem polímeros dinâmicos oferecendo possibilidade de troca de seus monômeros (devido a reversibilidade do grupo acilhidrazona) (JIN *et al.*, 2013) (LEHN, 2015).

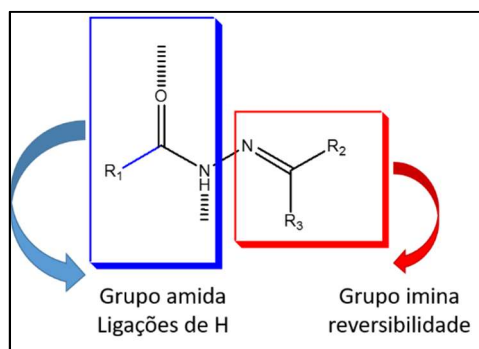


Figura 1.5. Representação dos sítios dinâmicos do grupo acilhidrazona: possibilidade de ligações de hidrogênio no grupo amida e ligação imina reversível.

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos nos últimos anos na formação de poliacilhidrazonas com essa subunidade tão amplamente conhecida da química farmacêutica, dentre os quais, os mais importantes são os desenvolvidos por Lehn e colaboradores, dos quais podemos citar o estudo da reversibilidade do grupo acilhidrazona gerando uma ampla diversidade de compostos (ONO; NOBORI; LEHN, 2005), (SKENE; LEHN, 2004). Deve-se mencionar também os estudos visando alterar as propriedades mecânicas de polímeros de acilhidrazonas (ONO *et al.*, 2007) ou a produção de sistemas que mimetizem proteínas (YU *et al.*, 2016). Há ainda relatos de trabalhos de estudo da reversibilidade das ligações para criar bibliotecas de monômeros na química combinatória (NGUYEN; HUC, 2003); na construção de géis de poliacilhidrazonas funcionais com complexos (HARDY *et al.*, 2012) e na construção de poliacilhidrazonas cliváveis para a liberação controlada de medicamentos (HU *et al.*, 2013).

1.2 SISTEMAS POLIMÉRICOS PARA A LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Uma análise crucial na área farmacêutica é a formação dos sistemas de administração de fármacos que necessitam de um controle temporal e espacial para que a carga fornecida seja suficiente no período desejado, mantendo-se as concentrações sanguíneas efetivas no local de ação e pelo maior tempo possível dentro da janela terapêutica (NICOLETTI; PAULA; FRASSON, 2006) (MA; MCHUGH, 2007) (JULIO; GALLARDO; LEVENFELD, 1995). Estudos que visem a descoberta de novos fármacos ativos têm constante atenção do mercado farmacêutico, porém a otimização das estratégias de formulação capazes de atender as demandas específicas de cada fármaco, melhorando a relação custo/benefício dos mesmos e melhorando a segurança terapêutica, é um atrativo para esta área (MA; MCHUGH, 2007) (CHOU; CARSON; WOODROW, 2015). Também deve ser considerada a necessidade de doses acumulativas para muitos tratamentos e a dificuldade da manutenção da terapia por parte do paciente (principalmente em doenças crônicas), que muitas vezes leva a uma administração falha dos fármacos (NICOLETTI; PAULA; FRASSON, 2006).

A formação de sistemas de liberação a partir de biomateriais têm crescido nos últimos anos, sendo uma ferramenta importante para gerar sistemas que modulem a liberação do fármaco de forma regular e em relação ao tempo, podendo ser também mais localizada para o sítio de ação específico, além de fornecerem melhoras quanto à eficácia e segurança (NICOLETTI; PAULA; FRASSON, 2006) (FENTON *et al.*, 2018). A formulação de um sistema de liberação implica em uma associação química ou física dos fármacos com materiais biocompatíveis gerando sistemas que quando administrados *in vivo* tenham a capacidade de controlar de forma pré-determinada a taxa de libertação/entrega do fármaco e/ou conduzi-lo até ao sítio específico de ação, ou até mesmo melhorar propriedades destes como a baixa solubilidade (GÖKE *et al.*, 2018). Estes sistemas são designados por sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos (COIMBRA, 2010) (OLIVEIRA; LIMA, 2006), e podem ser formulados para aplicações injetáveis, implantáveis ou orais (MA; MCHUGH, 2007), formados a partir de lipossomas, bombas osmóticas, revestimentos entéricos, sistemas transdérmicos, pró-fármacos ou materiais poliméricos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Os polímeros se destacam na formulação de sistemas de liberação por serem altamente resistentes, versáteis, de fácil preparo e baixo custo. Estes sistemas possuem diversas classificações que consideram a estrutura química da matriz, a cinética de liberação e os mecanismos de controle como intumescimento e difusão (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Os

polímeros utilizados em sistemas de liberação são escolhidos de acordo com o tipo de sistema e local de atuação podendo ou não ser biodegradáveis, hidrofílicos ou hidrofóbicos sendo necessário à sua escolha mediante a análise de sua associação com o fármaco (LIN, R.; CUI, 2015). Os sistemas de liberação podem assumir as seguintes classificações: a) solvente controlado, b) difusão controlada e c) quimicamente controlada (OTERO-ESPINAR *et al.*, 2010) (MARCOLONGO, 2003).

Os sistemas “solvente controlados” se baseiam na permeabilidade do polímero que costuma ser hidrofílico e formado a partir de géis; a liberação é dependente da taxa de hidratação da matriz polimérica e ocorre em etapas sendo que uma pequena parte é liberada imediatamente. Estão inclusos nesses sistemas alguns polímeros naturais como quitosana, pectina e amido, e alguns polímeros sintéticos hidrofílicos e biodegradáveis como o polivinilálcool e carboximetilcelulose. Os sistemas hidrofóbicos são também amplamente utilizados como carregadores de fármacos ou como suportes para fármacos via implantável (para sistemas não biodegradáveis como a policaprolactona) ou em *stents*. Sua principal forma de liberação ocorre na difusão do soluto do meio matricial e esta taxa de liberação é dependente da estrutura do material (homogêneo, microporoso) sendo a etapa crucial a permeação de água na superfície do mesmo. Estão entre os hidrofóbicos, matrizes lipídicas, lipossomas, e derivados acrílicos, bem como polímeros não biodegradáveis como a celulose. Já os sistemas quimicamente controlados são aqueles em que a taxa de liberação é controlada pela taxa de biodegradação do polímero sendo os mais usuais as proteínas, os polissacarídeos e os polímeros sintéticos, como a polilactamas (NICOLETTI; PAULA; FRASSON, 2006) (KAMALY *et al.*, 2016).

1.3 ELETROFIAÇÃO

Como uma classe de compostos de amplo interesse, os polímeros podem ser processados sob diversas formas como filmes, tubos, membranas, partículas ou fibras. O interesse é crescente em materiais de escala micro ou nanométrica nos últimos anos devido a possibilidade de geração de sistemas com maior área de contato superficial viabilizando assim diversas aplicações. Diante desse contexto, a técnica de formação de fibras poliméricas por eletrofiação tem se mostrado aplicável para obtenção de sistemas com essa finalidade uma vez que as fibras poliméricas apresentam relevantes propriedades como sua grande área superficial, a flexibilidade de sua matriz e suas propriedades mecânicas elevadas (COSTA *et al.*, 2012) (PANTHI *et al.*, 2015) (PELIPENKO; KOCBEK; KRISTL, 2015). A técnica de eletrofiação

permite a formação de fibras contínuas com diâmetros que podem chegar a nanômetros, podendo ser aplicada utilizando diversos tipos de sistemas tais como polímeros naturais, polímeros sintéticos, blendas poliméricas, nanopartículas dentre outros (GREINER; WENDORFF, 2007).

A técnica de eletrofiação, também conhecida como fiação eletrostática ou *electrospinning*, tem sua base na formação de aerossóis gerados a partir da aplicação de potenciais elétricos em gotas de fluidos, método descrito por Lord Rayleigh no estudo de quão alta deveria ser uma tensão aplicada para vencer a tensão superficial de um fluido (GREINER; WENDORFF, 2007). Mas foi somente em 1934 que o primeiro protótipo de um equipamento de eletrofiação foi descrito, na patente formulada por Anton Formhals que deu origem aos equipamentos, embora semelhantes, mas com finalidades diferentes, utilizados atualmente na produção de fibras (eletrofiação) ou de partículas (“*electrospray*”) (FORMHALS, 1934) (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

A eletrofiação consiste em um sistema (Figura 1.6) montado a partir de quatro componentes principais: a) uma fonte de alta tensão; b) uma bomba de infusão para a solução polimérica; c) uma agulha capilar ou bico injetor atuando como eletrodo para formação do jato e d) um coletor aterrado (ou com eletrodos contrários) na forma de placas ou tubos.

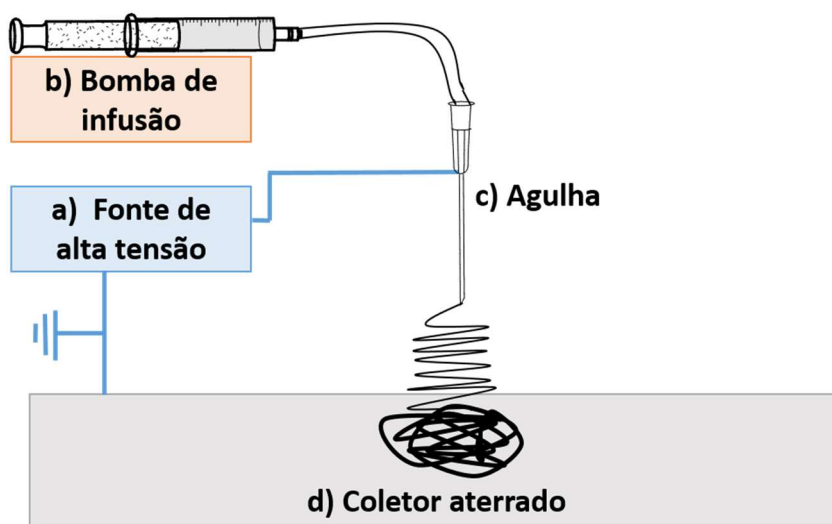


Figura 1.6. Representação dos principais componentes de um sistema de eletrofiação.

O processo de eletrofiação se dá por bombeamento da solução polimérica por uma bomba de infusão através de uma seringa agrupada a uma mangueira, que leva a solução polimérica injetada até a ponta de uma agulha ou bico injetor (normalmente com diâmetro em torno de 100 μm). Este por sua vez servirá como eletrodo sendo aplicada uma voltagem (1-30

kV) oriunda da fonte de alta tensão. A uma distância de 10-25 cm aproximadamente da ponta do bico injetor é então colocada um coletor que pode ser uma placa aterrada (com potencial zero volt) ou um contra eletrodo, que servirá como suporte para as fibras formadas (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015) (SILL; VON RECUM, 2008) (RUTLEDGE; FRIDRIKH, 2007) (HUANG *et al.*, 2003). O alinhamento entre o bico injetor, os eletrodos e a placa coletora é essencial durante o processo para fornecer a obtenção das fibras poliméricas.

A solução polimérica injetada recebe uma tensão elétrica capaz de gerar, na ponta do bico injetor, uma gota polimérica eletricamente carregada, que sofre ação de forças eletrostáticas como repulsão de cargas, a força gravitacional, a força eletrodinâmica (proporcional a voltagem aplicada) em contraste à tensão superficial do líquido. Como resultado deste somatório de forças, esta gota se torna uma forma cônica na ponta do capilar, conhecido como Cone de Taylor (Figura 1.7a). A contínua diferença de voltagem entre a ponta do capilar e a placa coletora vencendo a tensão superficial, é a responsável pela formação do jato estável em forma de bobina (Figura 1.7b), que leva a formação das fibras poliméricas, uma vez que o solvente é evaporado ao longo do percurso até a chegada ao coletor. A formação do cone de Taylor é um estágio fundamental para a formação de fibras uniformes e com diâmetros compatíveis às aplicações esperadas para estes sistemas (HUANG *et al.*, 2003) (JAWOREK; SOBCZYK, 2008).

Cada um dos componentes do sistema de eletrofiação representados na Figura 1.6, está associado a um conjunto de parâmetros do sistema (como a taxa do fluxo aplicado, a distância da placa ao coletor ou a voltagem aplicada) que devem ser analisados para objetivar a formação de fibras. Estes parâmetros podem influenciar diretamente a formação das fibras, podendo levar à formação de partículas ou fusos (Figura 1.7 c, d, e).

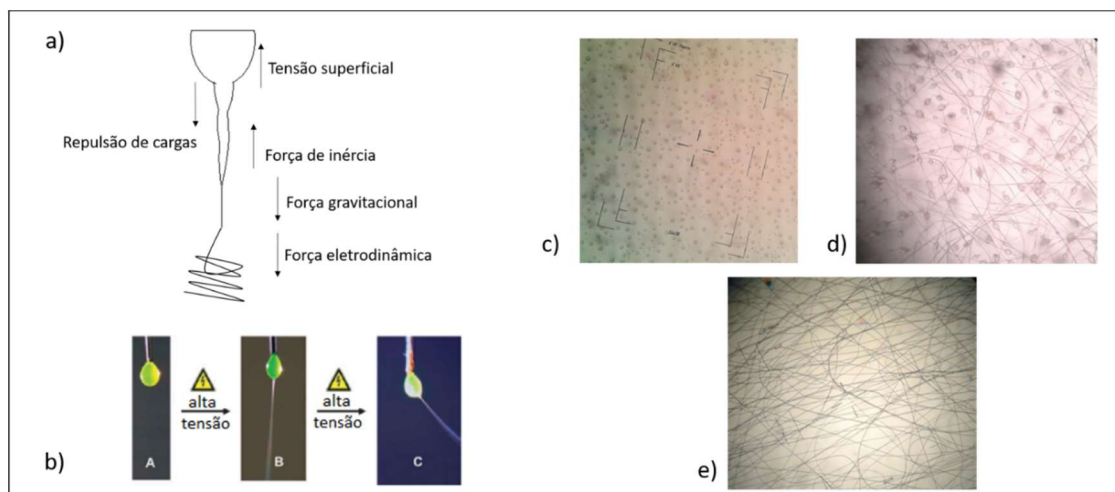


Figura 1.7. a) Representação das principais forças atuantes na formação do cone de Taylor b) formação do cone de Taylor para a solução de poli(óxido de etileno) a 5 % m/v após diferentes voltagens aplicadas (GREINER; WENDORFF, 2007) c) formação de partículas de PMMA 10% m/v observadas por microscopia óptica d) formação de fusos de PMMA 10 % m/v observados por microscopia óptica e) formação de fibras de PMMA 10% m/v observadas por microscopia óptica.

Além dos parâmetros do sistema, devem também ser analisados os parâmetros da solução polimérica e do ambiente (GREINER; WENDORFF, 2007). Apesar de muito parecidas, as técnicas de eletrofiação e a *electrospray* levam a produtos finais diferentes: no primeiro caso a formação de fibras e no segundo partículas. Uma diferença entre elas baseia-se na concentração da solução de polímero que, quando elevada e com um cone de Taylor estabilizado, leva a alongamento do fio do polímero e formação da fibra. Em contrapartida, soluções de baixa concentração levam a constantes desequilíbrios no jato polimérico formando gotículas não auto dispersantes no espaço, impedindo assim aglomeração destas em único jato, não formando fibras. A formação de partículas, fusos ou fibras por meio das técnicas de eletrofiação e *electrospray* dependem da finalidade das mesmas, sendo muito utilizadas na engenharia de tecidos, em sistemas de liberação de fármacos, formação de filtros e nanoencapsulação de ativos em alimentos (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

1.3.1 Sistemas coaxiais (*core-sheath*)

Fibras formadas através da técnica de eletrofiação podem ser designadas como uniaxiais ou coaxiais (também chamadas *core-shell*), podendo serem formadas pela combinação de mais de um material formador. Recentemente, fibras com uma morfologia *core-sheath* têm sido amplamente estudadas (OLIVEIRA; SUAREZ; ROCHA; DE CARVALHO TEIXEIRA;

CORTES; *et al.*, 2015), (BONADIES *et al.*, 2017), (CASTILLO-ORTEGA *et al.*, 2011), (NAJAFI-TAHER *et al.*, 2015).

Fibras com morfologia *core-sheath* são formadas utilizando o mesmo tipo de sistema de eletrofiação, porém com o uso de mais de uma bomba de injeção e agulhas específicas para formação destes sistemas. Estas agulhas são compostas por diferentes diâmetros interno e externo acoplados (Figura 1.8 a) e a escolha da agulha para a eletrofiação é essencial para o diâmetro final da fibra formada. O objetivo de se eletrofiar mais de uma solução simultaneamente é formar fibras com um tipo de material na parte interna da mesma ou centro (também denominado *core*) e um outro na parte externa ou na “casca” (denominado *shell*) (Figura 1.8 b). Do mesmo modo nesses sistemas, pode-se observar a formação de um cone de Taylor específico como mostrado na Figura 1.8 c, que já indica a obtenção de fibras nessa conformação, uma vez que é possível se distinguir as partes *core* e *shell* das mesmas. Esse tipo de fibra apresenta algumas vantagens em comparação às fibras uniaxiais, como uma melhor modulação da liberação de fármacos baseada nas interações formadas entre este e o material formador da fibra e melhoras nas propriedades mecânicas da mesma, além da proteção adicional de moléculas biologicamente ativas que podem ser contidas na parte interna da fibra (SPERLING *et al.*, 2016), (KHALF; MADIHALLY, 2017) (LU *et al.*, 2016). Ambos os tipos de fibras (uni ou coaxiais) estão sujeitos às mesmas modificações de parâmetros do sistema ou da solução polimérica.

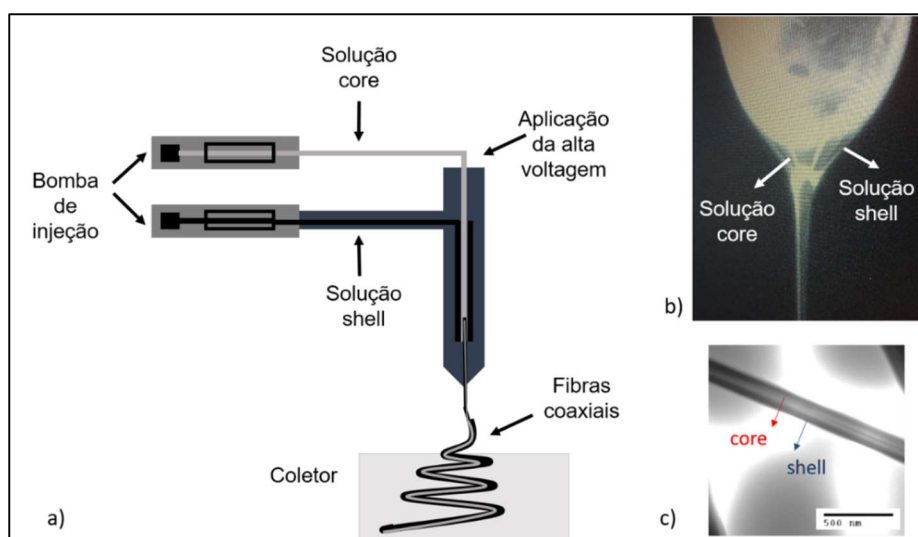


Figura 1.8. a) Representação esquemática de um sistema de eletrofiação de fibra coaxiais b) Imagem de um cone de Taylor para um processo de eletrofiação coaxial c) Imagem de uma fibra com morfologia *core sheath* (Fonte do autor).

1.3.2 Parâmetros que influenciam o sistema de eletrofiação

Não é possível generalizar os parâmetros que influenciam a obtenção de fibras por eletrofiação uma vez que estes dependem intrinsecamente do polímero utilizado. Porém, é possível citar alguns fatores e como eles afetam a formação das fibras.

Dentre os parâmetros envolvidos na formação da solução polimérica, a concentração do polímero, seu peso molecular, a volatilidade e condutividade do solvente utilizado podem afetar diretamente a formação de fibras por eletrofiação. A concentração do polímero é um fator fundamental na obtenção de fibras poliméricas: diversos trabalhos atribuem a concentração da solução polimérica à viscosidade da mesma (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015) (SILL; VON RECUM, 2008) (GREINER; WENDORFF, 2007). Se a solução polimérica não apresenta uma viscosidade suficiente para que haja interação entre as cadeias poliméricas estas soluções podem formar jatos instáveis e com a diminuição do emaranhamento levar a formação de partículas. Também é observado um aumento do diâmetro da fibra comparada às soluções menos concentradas, proveniente de uma maior aplicação de tensão para vencer a viscosidade da solução. O efeito da concentração da solução está diretamente ligado à tensão superficial da mesma: se a solução for muito diluída não ocorrerá formação de fibras antes da chegada ao coletor devido a tensão aplicada não conseguir formar o cone de Taylor (tensão superficial não é rompida). Em contrapartida, soluções demasiadamente concentradas podem tornar difícil a aplicação de tensão estável para formação das fibras uma vez que se torna difícil estabilizar o fluxo da solução (SILL; VON RECUM, 2008) (COSTA *et al.*, 2012).

A utilização de solventes condutores e com alta volatilidade também influencia a formação das fibras. Solventes com alguma condutividade ou adição de sais na formação de fibras poliméricas são ideais pois aumentam a condutividade elétrica da solução resultando em uma maior mobilidade dos íons e maior orientação e estabilidade do cone de Taylor, podendo formar fibras mais finas (COSTA *et al.*, 2012). A utilização de solventes voláteis também se faz necessária uma vez que influenciam a morfologia das fibras e a formação de poros na estrutura: quanto maior a volatilidade do solvente (como exemplo o tetrahidrofurano-THF) maior a formação de poros na estrutura e um consequente aumento no diâmetro. Em contrapartida, solventes com baixa volatilidade (como a dimetilformamida-DMF) levam a fibras mais lisas e achatadas (BAJI *et al.*, 2010) (SILL; VON RECUM, 2008)(GREINER; WENDORFF, 2007).

Os parâmetros como a tensão, o fluxo da bomba injetora e a altura do bico injetor ao coletor são os parâmetros controláveis do sistema. A tensão aplicada implica diretamente na

obtenção das fibras uma vez que tensões muito baixas não conseguem vencer as forças de tensão superficial, porém tensões muito altas podem levar a formação de fibras sem antes formar o cone de Taylor (fibras formadas de dentro do bico injetor) e então fibras sem uniformidade. Tensões mais elevadas são ideais para formar fibras mais finas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010) (SILL; VON RECUM, 2008).

O fluxo aplicado atua diretamente na morfologia das fibras: fluxos mais baixos são preferenciais para a formação de fibras mais secas uma vez que o solvente consegue evaporar em uma taxa mais elevada no percurso do bico injetor à placa; em contrapartida, fluxos muito elevados, sem o devido ajuste de tensão, levam à formação de fibras molhadas e com perda em sua morfologia. Também é observado que em maiores fluxos formam-se fibras de maior diâmetro (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A distância entre o bico injetor e a placa coletora é um parâmetro extremamente importante a ser avaliado na formação de fibras secas, já que distâncias elevadas com baixas tensões podem não permitir a secagem do solvente influenciando também na morfologia das fibras. Menores distâncias sem a secagem ideal dos solventes podem levar à fibras planas e não cilíndricas (BAJI *et al.*, 2010) (SILL; VON RECUM, 2008).

1.4 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do presente trabalho é a síntese de polímeros de acilhidrazonas e a formação de sistemas de liberação de fármacos através de materiais poliméricos por meio da técnica de eletrofiação. Para a construção destes sistemas utilizando os polímeros sintéticos de acilhidrazonas, tem se juntamente a utilização de polímeros comerciais como PMMA e PCL, que também foram utilizados na construção de sistemas mono e coaxiais para liberação controlada de fármacos hidrofóbicos, utilizando como modelo o fármaco Nimesulida.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Sintetizar polímeros de acilhidrazonas (poliacilhidrazonas) compreendo sua formação por meio de técnicas como espectroscopia na região do infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear uni e bidimensional;

-Investigar a potencial capacidade dos intermediários da síntese das poliacilhidrazonas (hidrazidas) quanto à ação anti-inflamatória *in vitro* uma vez que não há relatos dessa investigação na literatura bem como analisar sua citotoxicidade;

-Associar, por meio da técnica de eletrofiação, poliacilhidrazonas sintetizadas com polímeros comerciais como PMMA avaliando o efeito desta hidrazida na fibra obtida;

-Preparar blendas dos polímeros comerciais PMMA e PCL, com e sem a presença do fármaco Nimesulida, através da técnica de eletrofiação e estudar os aspectos morfológicos, térmicos, mecânicos e de liberação dos sistemas obtidos bem como a citotoxicidade destes sistemas;

-Preparar fibras coaxiais poliméricas (fibras *core-sheath*) associando PMMA e PCL e o fármaco hidrofóbico Nimesulida como modelo e comparar os resultados das fibras coaxiais com as blendas uniaxiais;

CÁPITULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS: SÍNTESE DE POLIACILHIDRAZONAS E FORMAÇÃO DE FIBRAS POLIMÉRICAS

2.1.1 *Reação de esterificação: Esterificação de Fischer*

Os ácidos glutárico (99 %, Sigma Aldrich) e isoftálico (99 %, Sigma Aldrich) foram submetidos à reações de esterificação de Fischer conforme descrito na literatura (SOLLADIE; ZIANICHERIF, 1993). Cerca de 0,2-0,5 g dos ácidos foram adicionados à 15-20 mL de metanol (CH_3OH) (99,8 %, VETEC) seguidos de 8 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (95-99 %, VETEC). As reações foram conduzidas sob sistema de refluxo em chapa de aquecimento (IKA C-MAG HS7) à temperatura de 70 °C durante 17-24 h até que por cromatografia em camada delgada (Placas de sílica gel FLUKA com fluorescência a 254 nm) eluídas em acetato de etila (99,5 %, VETEC) / CH_3OH (99,85 %, VETEC) na proporção 1:1 v/v se observasse o término da reação. As reações foram finalizadas com o ajuste do pH do meio reacional com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹ seguidos de sucessivas extrações com clorofórmio (CH_3Cl) (99 %, Sigma Aldrich). As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de magnésio anidro (99 %, ECIBRA) seguidas de retirada do solvente no evaporador rotatório (IKA RV 10 DIGITAL com banho de aquecimento IKA HB 10 DIGITAL). Quando necessário, os produtos foram purificados em coluna cromatográfica com eluição gradiente em sílica (Sigma Aldrich, 60 A, 230-400 MESH) utilizando como solventes acetato de etila (99,5 %, VETEC) / hexano (VETEC). Os produtos finais foram obtidos como sólidos brancos, com rendimentos de 70-82 % sendo em seguida caracterizados para a elucidação estrutural.

2.1.2 *Reação de hidrazinólise*

Os ésteres obtidos anteriormente glutarato de dimetila e isoftalato foram submetidos a reação de hidrazinólise seguindo a metodologia descrita na literatura (DUARTE *et al.*, 2007). Em cerca de 0,5-0,7 g dos ésteres foram adicionados hidrato de hidrazina (solução 80 % em água, Merck) na proporção de éster/ hidrato de hidrazina 1: 20 (mol/mol), seguida de adição de 10 mL de CH_3OH . A reação foi conduzida a temperatura ambiente por um intervalo de tempo que variou de 4-9 h. A reação apresentou cerca de 70 % de rendimento e observou-se ao final

deste período reacional a formação de precipitados brancos que foram lavados em metanol gelado e filtrados dando origem as respectivas hidrazidas.

2.1.3 Reações de acoplamento entre hidrazidas e aldeídos

Para a formação das poliacilhidrazonas, as correspondentes hidrazidas foram solubilizadas por sucessivos intervalos de agitação em agitador magnético (IKA C-MAG HS7) seguidos de ultrassonificação (VWR Symphony, 35 KHz) em 20 mL de CH₃OH com adição de 2 gotas de ácido acético. Em seguida, foram adicionados glutaraldeído (solução 70 % em água Sigma Aldrich) ou isoftalaldeído (97 %, Sigma Aldrich) na proporção 1:1 (mol/mol) e a reação foi deixada em agitação sem aquecimento durante 8 h. O produto final obtido foi um filme amarelado para o polímero originado de glutaraldeído e um sólido branco para o polímero originado de isoftaldeído, que foram lavados com água e metanol e secos em seguida.

2.1.4 Formação de fibras de PMMA 10% (m/v) e poliacilhidrazonas

As nanofibras poliméricas foram obtidas utilizando a técnica de eletrofiação após análise da literatura e escolha dos melhores parâmetros (WANG, H. *et al.*, 2010) (JOSHI *et al.*, 2015). Para a formação dessas fibras, foi utilizado o equipamento do Laboratório de Sistemas Poliméricas e Supramoleculares (LSPS) da Universidade Federal de Itajubá. O equipamento é composto por uma bomba de infusão (Harvard Apparatus PHD 2000 Infusion) e de um gerador de voltagem (Gamma High Voltage).

Para a formação da fibra de polimetilmetacrilato 10 % (m/v) (MM= 350.000 g.mol⁻¹, Polysciences) com poliacilhidrazona 4 % (m/m em relação ao PMMA) foram adicionados 0,0312 g da poliacilhidrazona em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (99,5 %, NUCLEAR). Esta poliacilhidrazona formou uma dispersão estável na solução do solvente em uma análise qualitativa durante 2 semanas. Em seguida, foram adicionados a esta solução 0,72 g de PMMA e 6 mL de solução dimetilformamida (DMF) (99,8 %, VETEC) / tetrahidrofurano (THF) (99 %, VETEC) na proporção 7:3 sem que houvesse precipitação, formando então uma dispersão.

Para a formação das fibras, o potencial elétrico aplicado no bico injetor foi de 7 kV utilizando o gerador de voltagem. As soluções poliméricas foram injetadas com um fluxo de 5 mL/h, utilizando a bomba de infusão previamente descrita, sendo a distância utilizada entre o bico injetor e a placa coletora de 20 cm. Essa placa coletora de metal foi aterrada para que a diferença de potencial entre esta e o bico injetor fosse obtida e as fibras fossem formadas.

2.1.5 Ensaio de avaliação *in vitro* do perfil de inibição da inflamação para hidrazidas intermediárias

Para a avaliação *in vitro* do efeito anti-inflamatório das hidrazidas, foi utilizado o método descrito por Mizushima (MIZUSHIMA; KOBAYASHI, 1968) e adaptado em outros trabalhos (KUMARI *et al.*, 2015)(OSMAN *et al.*, 2016). O método foi realizado em colaboração com a University of Portsmouth-UK durante a realização do período de doutoramento sanduíche. As hidrazidas testadas foram mantidas em uma solução de tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 50 µg/mL. Do mesmo modo, os fármacos padrão escolhidos, Nimesulida (inibidor seletivo de ciclooxigenase COX-2) e ácido acetilsalicílico (inibidor não seletivo) foram testados nessa concentração. Uma solução aquosa de 5 % de albumina sérica bovina (Sigma Aldrich) foi preparada, e para se testar a inibição proteica da albumina, as soluções de volume final de 3 mL foram preparadas contendo: 0,12 mL de solução 5% de albumina, 1,68 mL de PBS e 1,2 mL de soluções de hidrazidas ou de fármaco padrão (controle positivo). A mesma quantidade (3 mL) de água destilada foi usada como controle negativo. As amostras foram incubadas à 37 °C por 30 minutos e então aquecidas a 70 °C por 5 min. Após resfriamento, as amostras foram avaliadas quanto à turbidez em espectrofotômetro UV-VIS em 660 nm, bem como as soluções com os fármacos padrão utilizados como controle positivo. As leituras foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada como:

$$\text{Porcentagem de inibição} = \frac{(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra})}{(\text{Absorbância do controle}) \times 100} \quad \text{Eq. 2.1}$$

2.1.6 Avaliação da citotoxicidade – ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado tanto para as blendas (fibras obtidas por eletrofiação) quanto para as hidrazidas intermediárias 4a e 4b. Os ensaios não foram realizados para as fibras coaxiais, uma vez que se tratam dos mesmos polímeros, e nem mesmo para os polímeros de acihidrazonas já que demonstraram baixa solubilidade. Os ensaios foram realizados em colaboração com o Laboratório de Ensaio Celulares e Medicina Regenerativa-LECER da Universidade de Araraquara-UNIARA.

Para a realização do ensaio, foram utilizadas células de fibroblastos de ratos de linhagem celular L929 para as blendas poliméricas, células de fibroblastos humanos de linhagem GM07492 para as hidrazidas. Ambos os grupos de células utilizadas foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio de cultivo “Dulbecco’s modified Eagle médium”- DMEM (Gibco/ Thermofisher) suplementado com Soro Bovino Fetal – SBF (Nutricell) com penicilina e estreptomicina 10 U/mL (Sigma). Estas células foram mantidas em condições ideais de cultura por 24 h (temperatura da estufa de 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico). Simultaneamente, para o ensaio com as fibras poliméricas, as mesmas foram recortadas em círculos de aproximadamente 5 mm de área que em seguida foram esterilizados em luz ultravioleta (UV) por 1 h. Para as hidrazidas houve o mesmo processo de esterilização com 20 mg de amostra. Após esterilização as fibras previamente cortadas e as hidrazidas em soluções de 20 mg/mL, foram acondicionadas em placas de cultura de células com 96 poços, e sobre as fibras foi adicionado um contingente celular de aproximadamente 5×10^3 e sobre as hidrazidas 1×10^4 . Os mesmos foram mantidos em condições de cultura por 24 h (37 °C em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico, por 24 h). Após o período experimental decorrido, os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) 1X, e foram adicionados 50 µL de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio MTT sendo então as placas novamente incubadas em estufa 37°C por 4 h. Após as 4 h, 100 µL de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Os valores de densidade óptica (DO) foram obtidos através das leituras em espectrofotômetro (Polarisceler) a um comprimento de onda (λ) de 570 nm e em seguida foram então convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa à amostra do controle negativo (DMEM + soro bovino fetal + antibióticos). O controle positivo utilizado foi DMEM + 25 % dimetilsulfóxido (DMSO). Os ensaios foram preparados em triplicata.

2.2 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS: FORMAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS DE PMMA E PCL

2.2.1 Formação das fibras uniaxiais de PMMA, PCL e suas blendas

A formação das fibras uniaxiais foi realizada no Laboratório de Sistemas Poliméricos e Supramoleculares-LSPS-UNIFEI. Foram preparadas soluções contendo a quantidade fixa de 0,6 g de polimetilmetacrilato (PMMA) ($350.000 \text{ g.mol}^{-1}$, Polysciences) 12% m/m variando-se

as proporções de policaprolactona (PCL) ($MM=43.000-50.000 \text{ g.mol}^{-1}$, Polysciences) em 6, 12 e 21 % m/v (0,03 / 0,06 e 0,10 g respectivamente) utilizando como solvente a mistura anidra DMF: THF (5 mL) na proporção de 7:3 (v/v). Essas soluções foram mantidas sob agitação durante 48 h até que todo o polímero fosse dissolvido.

Para a formação das fibras, o potencial elétrico aplicado no bico injetor foi de cerca de 6 a 12 kV utilizando o gerador de voltagem. As soluções poliméricas foram injetadas com um fluxo de 5,0 a 6,5 mL/h, utilizando a bomba de infusão previamente descrita, sendo a distância utilizada entre o bico injetor (atuando como eletrodo) e a placa coletora de cerca de 18-20 cm. A placa coletora de metal foi aterrada para que a diferença de potencial entre esta e o bico injetor fosse obtida.

Após obtenção das fibras de PMMA e PCL houve a formação das mesmas fibras com adição do fármaco Nimesulida (30 mg ou 60 mg). Os parâmetros para obtenção das fibras com Nimesulida foram semelhantes aqueles utilizados para as respectivas fibras anteriores, isso porque algumas pequenas variações na tensão, na distância e no fluxo das soluções foram necessários para se manter o processo de eletrofiação constante, garantindo a uniformidade das fibras.

2.2.2 Formação das fibras coaxiais de PMMA e PCL

As fibras com estrutura morfológica de casca e centro, conhecidas como “*core sheath*” e também designadas *core-shell*, foram preparadas na School of Pharmacy and Biomedical Sciences – University of Portsmouth (Reino Unido) utilizando-se os mesmos polímeros que na formação das fibras uniaxiais. Para a formação das mesmas, foram preparadas duas soluções: a solução de PMMA 12 % m/m em DMF: THF na proporção 7:3 que foi utilizada como polímero formador da parte *core* (centro) das fibras e a solução de policaprolactona (PCL) 32 % m/m em DCM : DMF (9:1) utilizada com polímero formador da parte *sheath* (casca) das mesmas. A fim de comparar o efeito do fármaco Nimesulida na parte interna e externa da fibra, o mesmo foi adicionado em quantidade de 30 mg nas soluções dos polímeros, e as seguintes fibras foram formadas: PMMA (*core*) / PCL (*sheath*) sem o fármaco Nimesulida; PMMA e Nimesulida (*core*) / PCL (*sheath*); PMMA (*core*) / PCL e Nimesulida (*sheath*). Com o objetivo comparar a obtenção das fibras nos dois equipamentos distintos, as fibras uniaxiais de PMMA e PCL também foram eletrofiadas. A escolha da localização dos polímeros nas fibras se deu com o intuito de promover uma melhora mecânica nas fibras de PMMA por adição de PCL, permitindo a proteção da fibra mais quebradiça (PMMA) na parte interna pela fibra mais

elástica (PCL) na parte externa da fibra coaxial. Essas soluções foram mantidas sob agitação durante 48 h até que todo o polímero fosse dissolvido.

Após completa solubilização, as soluções foram eletrofiadas separadamente com o auxílio de duas bombas de injeção (World Precision Instruments, Florida, US) e uma agulha coaxial (diâmetro externo de 2.11 mm e diâmetro interno de 1.07 mm), utilizando-se o sistema de eletrofiação Spraybase (Avectas). A Figura 2.1 apresenta a imagem do equipamento coaxial utilizado e a Tabela 2.1 os parâmetros utilizados na construção dos sistemas *core-sheath*.

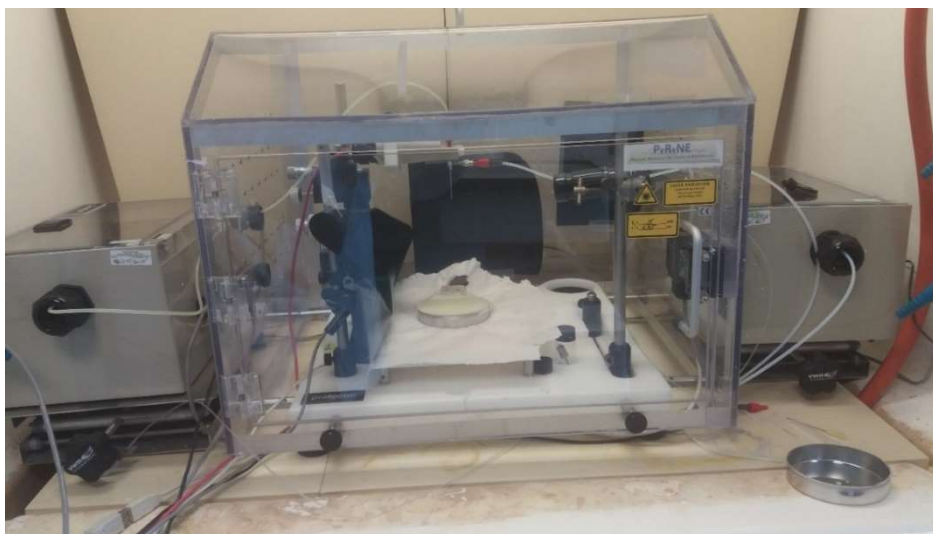


Figura 2.1. Equipamento de eletrofiação utilizado na formação dos sistemas *core-sheath*.

Tabela 2.1. Parâmetros utilizados no sistema de eletrofiação para a formação das fibras coaxiais

Fibras	Fluxo da solução de PMMA ou PMMA/Nimesulida (mL/h)	Fluxo da solução de PCL ou PCL/Nimesulide (mL/h)	Distância do bico injetor à placa coletora (cm)	Potencial elétrico do bico injetor (kV)
PMMA	6,0	---	16	6,0
PCL	---	2,0	15	8,5
PMMA/PCL sem Nimesulida	3,5	1,5	15	7,0
PMMA/Nimesulida (<i>core</i>) e PCL (<i>sheath</i>)	3,5	1,2	15	7,0
PMMA (<i>core</i>) e PCL/Nimesulida (<i>sheath</i>)	2,5	1,5	15	7,5

2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS POLIACILHIDRAZONAS E INTERMEDIÁRIOS

Os espectros na região do infravermelho obtidos por refletância total atenuada (FTIR-ATR) foram registrados em aparelho da marca Spectrum 100 Perkin Elmer utilizando cristal de Seleneto de Zinco. Os experimentos foram feitos à uma resolução de 4 cm^{-1} , em intervalos de 1 cm^{-1} com acumulações de 32 varreduras por amostra, à temperatura ambiente. Todos os espectros foram obtidos em % Transmitância para a região de $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$ e analisados no programa Spectrum 6.3. As medidas foram realizadas na Universidade Federal de Itajubá.

Os espectros de massas foram realizados em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ /RJ), em um espectrômetro de massas do tipo Micromass/Waters, modelo ZQ-4000, com ionização por Electrospray (ESI-MS), Scan ES^+ Capilar 3,0 kV, cone 30 V, extrator 1V, RF lente 1,0 V, temperatura da fonte 150°C e temperatura de dessolvatação 300°C .

As análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C para os intermediários foram realizadas na Central Analítica (Fiocruz/RJ), à $400,00\text{ (RMN } ^1\text{H)}$ e $400,00\text{ (RMN } ^{13}\text{C)}$ MHz, usando um instrumento BRUKER Avance com sonda de 5mm. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno e dimetilsulfóxido ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$) como solvente.

As análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , *Distortioneless Enhancement by Polarization Transfer* -DEPT-135, *Heteronuclear Single Quantum Correlation* -HSQC ($^1\text{Hx DEPT}$) e *Heteronuclear multiple bond correlation* -HMBC ($^1\text{Hx DEPT}$) para os polímeros finais foram realizadas a $400,00\text{ (RMN } ^1\text{H)}$ e $400,00\text{ (RMN } ^{13}\text{C)}$ MHz em espectrômetro Bruker DRX 400 AVANCE (400 MHz) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como solvente. Os espectros foram analisados no programa MestreC® ou Origin 7.0®.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS

Para a caracterização das fibras poliméricas, além da técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com refletância atenuada (FTIR-ATR), anteriormente citada, foram utilizadas as demais técnicas descritas abaixo. Para as fibras coaxiais os espectros de FTIR-ATR foram obtidos a partir de análises utilizando o equipamento Perkin Elmer Spectrum 100 na School of Pharmacy and Biomedical Sciences – University of Portsmouth (Reino Unido) utilizando cristal de Seleneto de Zinco. Os experimentos foram feitos à uma

resolução de 4 cm^{-1} , em intervalos de 1 cm^{-1} com acumulações de 36 varreduras por amostra, à temperatura ambiente. Todos os espectros foram obtidos em % Transmitância para a região de $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$.

2.4.1 Caracterização de superfície

A medida do ângulo de contato da água com as fibras foi realizada para explorar as características de hidrofília e hidrofobia da superfície dos sistemas poliméricos. Para as fibras uniaxiais, as medidas foram realizadas em aparelho Krüss GmbH Germany, modelo FM40MK2 Easy Drop localizado na Central Analítica do Instituto de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá. Para as fibras *core-sheath* as análises foram realizadas no mesmo modelo de equipamento na University of Portsmouth, Reino Unido sob as mesmas condições. Para as análises, foram adicionadas gotas de água (volume de $10\text{ }\mu\text{L}$ para cada gota) sobre cada uma das nanofibras e realizadas 7-10 medidas do ângulo de contato da água com a superfície do material. Os valores foram observados para cada um dos sistemas e foi obtido uma média desses valores e seus respectivos desvios padrão.

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada para se analisar a morfologia das fibras utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss-EVO MA15 localizado no Laboratório de Caracterização Estrutural da UNIFEI para as análises das fibras uniaxiais e para as fibras coaxiais foi utilizado o equipamento JEOL-6060LV (JEOL Ltd, Japan) operando a 5 kV da University of Portsmouth, Reino Unido. As amostras foram presas com o auxílio de uma fita dupla face à um suporte metálico e receberam uma camada de ouro em um QUORUM Q150R ES (durante 120 s , sob uma corrente de 20 mA) permitindo a análise da superfície do material. A análise do diâmetro das nanofibras obtidas foi realizada pelo Software Smart SEM e também no Software Image J em magnitudes de $500-10.000\text{ X}$, sendo para isso utilizadas médias de 60 medidas.

2.4.2 Caracterização térmica

As medidas de termogravimetria (TG) para as fibras uniaxiais preparadas foram realizadas no equipamento METTLER TG 50; com balança METTLER MT5 e controlador METTLER TC 11 TA PROCESSOR, sob atmosfera de nitrogênio à 30 mL/min , na faixa de temperatura de 37 à $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ analisados em Software GraphWare Mettler. O equipamento se encontra localizado no Laboratório de Análises Térmicas do Centro de Estudos, Investigação e

Inovação em Biomateriais e Biotecnologia da Universidade Federal de Itajubá. Para as fibras coaxiais foi utilizado o equipamento TG-209 F1 instrument (Netzsch, Germany) da University of Portsmouth atuando na faixa de temperatura de 20 à 800 °C, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e de 800 à 1000 °C sob ar (50 mL/min).

As medidas de DSC para as fibras uniaxiais foram obtidas em DSC1 STARe da Mettler Toledo. Foram utilizadas massas em torno de 6mg, cadinho de alumínio aberto e atmosfera de ar estático, em razões de aquecimento 10°C/min. As análises foram realizadas de -30 à 0 °C e de 0 à 200 °C respectivamente. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista Campus Araraquara. Para as fibras coaxiais utilizou-se o equipamento DSC-214 Polyma instrument (Netzsch, Germany) equipado com CC203 acessório de nitrogênio líquido. Foram utilizadas 10 mg de cada amostra em razões de aquecimento de -90 to 250 °C sob atmosfera de nitrogênio na taxa de aquecimento de 10 °C/min (2 ciclos).

2.4.3 Caracterização mecânica

2.4.3.1 Análise termomecânica TMA

A análise termomecânica de tensão *versus* deformação foi realizada em equipamento METTLER TMA 40 com controlador METTLER TC 11 TA PROCESSOR no Laboratório de Análises Térmicas do Centro de Estudos de Investigação e Inovação em Biomateriais da Unifei, com um sistema de forças de 0,05/0,1 e 0,2 N aplicados pela ponta de prova com terminação em gancho arredondado em um intervalo de tempo de 30 s para cada força. A ponta de prova esférica utilizada apresentou área de 3,16 mm² (como mostrado na Figura 2.2) e as fibras utilizadas apresentaram espessura constante de 0,383 mm sendo o resultado analisado em um computador acoplado ao equipamento pelo Software GraphWare Mettler. Estes ensaios foram realizados apenas para as fibras uniaxiais.

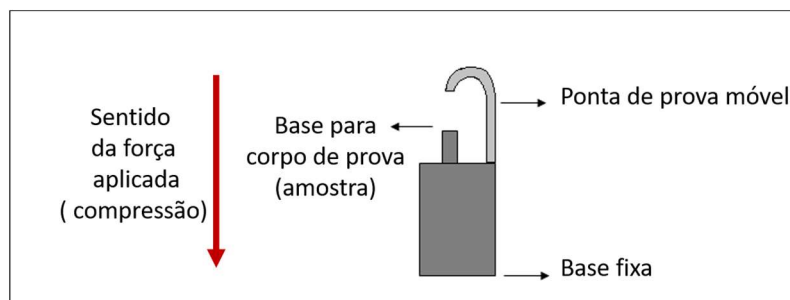


Figura 2.2. Esquema dos componentes em um ensaio de análise termomecânica- TMA.

A partir dos experimentos de análise termomecânica foi possível se obter gráficos de deformação *versus* tempo e assim analisar qual a deformação ocorrida mediante o sistema de forças aplicado, para cada uma das fibras.

2.4.3.2 Análise em texturômetro

A análise em texturômetro foi realizada com o objetivo de se encontrar para as fibras testadas, os valores de Resistência à perfuração (R_p), Alongamento na ruptura (E_b) e Energia na ruptura (E_p). Este ensaio, diferentemente do ensaio *deformação versus tempo* obtido no TMA é um ensaio de *tensão X deformação até a ruptura*, e o maior objetivo é mensurar os aspectos referentes à ruptura da fibra testada mediante à aplicação de uma tensão. A análise de resistência à ruptura (para as fibras uniaxiais) foi realizada em colaboração com a Universidade Estadual Paulista (UNESP-Araraquara) em equipamento texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems) com ponta de prova esférica (25 mm) como exemplificado na Figura 2.3. Foram cortadas amostras de diâmetros de 50 mm, e a ponta de prova foi movida em direção à fibra com velocidade de 1 mm s^{-1} e durante o teste apresentou velocidade constante de 0.1 mm.s^{-1} . A força inicialmente aplicada foi de 0,005 kg e as medidas foram acompanhadas até a ruptura (com incrementos de força sucessivos até a ruptura) para se obterem os dados de resistência a perfuração (R_p), Alongamento na ruptura (E_b) e energia de perfuração (E_p). As amostras foram avaliadas em triplicata e os valores foram avaliados estatisticamente por meio do programa GraphPad Prisma 5, utilizando o Teste ANOVA com intervalo de confiança de 95 % (nível de significância $p < 0,05$) e pós teste de Tuckey para comparações múltiplas. Para as fibras coaxiais, o equipamento de mesma descrição foi utilizado, na University of Portsmouth sob os mesmos parâmetros.



Figura 2.3. Imagem de um texturometro Stable Micro Systems ®.

O cálculo para o valor de R_p é semelhante ao utilizado para o valor de σ no ensaio de *tensão X deformação*, mas aqui o valor de tensão utilizado é a partir da ruptura ou perfuração da amostra, também chamado de resistência à ruptura descrito como a equação abaixo:

$$R_p = \frac{F}{A} \quad \text{Eq.2.2}$$

Em que F é a força aplicada até o ponto da ruptura e A a área da seção transversal da fibra em (mm^2) de espessura conhecida. O valor de R_p é expresso em MPa.

Para o cálculo do Alongamento na ruptura, ou seja, o alongamento da fibra até o momento da ruptura, utilizamos a seguinte equação:

$$Eb = \frac{\sqrt{r^2 + d^2} - r}{r} * 100 \quad \text{Eq.2.3}$$

Em que r é o valor do raio da exposição da fibra na superfície do suporte (mm) e d é o valor da distância percorrida pela ponta de prova durante a aplicação de forças antes da ruptura. O valor de Eb é expresso em porcentagem.

2.4.3.3 Análise de permeabilidade ao vapor de água (PVA)

As medidas de permeabilidade ao vapor de água foram realizadas no Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BIOPOLMAT) da Universidade de Araraquara - UNIARA (para as fibras uniaxiais) e na School of Pharmacy and Biomedical Sciences – University of Portsmouth (Reino Unido) para as fibras coaxiais, seguindo metodologia descrita por AKHGARI *et al.*, 2006 em ambas as análises. Seções circulares das fibras foram cortadas em mesmo tamanho (1.1 cm de diâmetro) e fixadas em tampas de tubos de vidro de capacidade de 10 mL, preenchidos com este volume de água. A medida das espessuras das fibras foi efetuada em micrômetro digital ZAAS PRECISION ($\pm 0,001$ mm) em triplicata e obtida uma média desses valores e o desvio padrão correspondente. Os vidros contendo água e a fibra foram pesados e colocados em um dessecador (com sílica gel seca) e a perda de massa foi acompanhada por pesagem dos sistemas durante 5 dias. As medidas de permeabilidade também foram efetuadas em duplicata para cada fibra e os valores foram avaliados estatisticamente por meio do programa GraphPad Prisma 5, utilizando o Teste ANOVA com intervalo de confiança de 95 % (nível de significância $p < 0,05$) e pós teste de Tuckey para comparações múltiplas.

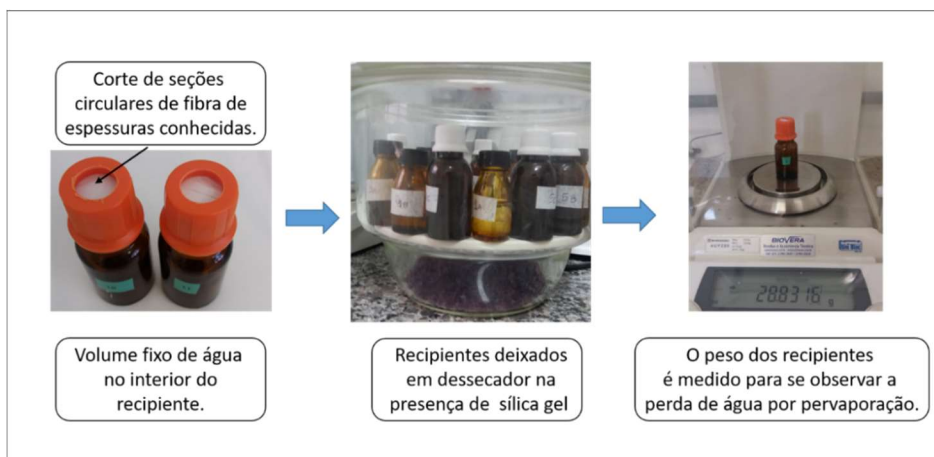


Figura 2.4. Representação do ensaio de permeabilidade ao vapor de água.

O valor de permeabilidade ao vapor de água (PVA) é dado como:

$$PVA = \frac{TTVA \times L}{\Delta P} \quad \text{Eq. 2.4}$$

Em que TTVA é a taxa de transmissão de vapor de água, L é a espessura da fibra (mm) e ΔP é a diferença da pressão de vapor da água e da atmosfera na área exposta do filme. O valor de TTVA pode ser obtido a partir de um gráfico de *perda de massa x tempo* nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 92 e 120 h. Encontrando-se a equação da reta que descreva esse gráfico através da regressão linear, é possível se encontrar o valor da inclinação de cada reta (*slope*). Este valor é o valor de TTVA, ou seja, a taxa de permeação ao vapor de água para cada fibra.

2.4.4 Caracterização *in vitro* do sistema de liberação- fibras uniaxiais

A espectroscopia de absorção na região do UV visível foi utilizada para construir a curva de calibração do fármaco Nimesulida (em tampão fosfato salino PBS pH 7,4) bem como para se obter as medidas de absorbância no teste preliminar de liberação *in vitro* para o fármaco. As medidas foram realizadas em Espectrofotômetro Varian Cary 50 Scan utilizando cubetas de quartzo, sendo realizada a curva de calibração da Nimesulida na faixa de 800-190 nm, com concentrações de 0,020 a 0,001 mg.mL⁻¹ ou 64,0 a 3,2 µmol.L⁻¹. As leituras de absorbância para o ensaio preliminar de liberação *in vitro* foram realizadas em 392 nm, sendo este indicado a banda de identificação para o fármaco Nimesulida. Todos os resultados foram analisados no programa Cary WinUV.

Para o ensaio de liberação *in vitro* das blendas de PMMA e PCL foram retiradas amostras de 30 mg das blendas contendo 30 mg de Nimesulida (em triplicata), as quais foram inseridas em tubo Falcon com 7 mL de tampão PBS pH 7,4. Os tubos foram mantidos em estufa, à 37 °C durante 14 dias sendo realizadas medidas de absorbância destas soluções através da retirada de alíquotas de 1 mL do meio bem como reposição de 1 mL de tampão para se manter o volume final constante. Durante as primeiras 24 h as leituras de medida de absorbância foram realizadas de hora em hora; para os demais dias, as leituras foram espaçadas de 24 em 24 h.

2.4.5 Caracterização *in vitro* do sistema de liberação formados pelas fibras coaxiais

Para análise do perfil de liberação *in vitro* das fibras coaxiais, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para construir a curva de calibração do fármaco Nimesulida (em Acetonitrila/ PBS 1:1) bem como para se obter a quantificação de cada amostra no teste preliminar de liberação *in vitro* para o fármaco. As medidas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent Technologies 1100 series / 1200 detector, utilizando-se coluna cromatográfica C8 Zorbax 300SB-C8 de 4,5 mm x 25 cm, sob solvente Acetonitrila / Tampão PBS 1:1, Fischer, grau HPLC. As corridas cromatográficas foram realizadas com análise da área em 392 nm, sendo este indicado a banda de identificação para o fármaco Nimesulida.

Para a caracterização do sistema de liberação formado pelas fibras coaxiais foi escolhido como modelo para o ensaio de liberação do fármaco o sistema de liberação tipo Franz Cell Type (Figura 2.5), e o ensaio foi realizado na School of Pharmacy and Biomedical Sciences – University of Portsmouth (Reino Unido). As fibras coaxiais foram cortadas em círculos de área difusional de 1 cm², e os dois compartimentos (doador e receptor) foram preenchidos com tampão fosfato salino PBS em pH 7,4 (1 mL para o compartimento doador e cerca de 3,6 – 3,8 mL para o compartimento receptor), com a presença de uma barra magnética de 5×2 mm adicionada ao compartimento receptor para manter o meio homogêneo. A fim de aumentar a solubilidade do fármaco no compartimento receptor, uma solução 0.1 % m/m do polímero Soluplus® em PBS foi adicionada. Para mimetizar o efeito de uma membrana para permeação do fármaco e também para suportar as fibras poliméricas, uma membrana de acetato de celulose sintética (círculos de 2,4 cm de diâmetro) foi utilizada (peso molecular de 12–14 kDa) e montada adequadamente conforme mostrado na Figura 2.5 c. O sistema Franz Cell foi então incubado em um banho sob agitação e temperatura constante de 37 °C, e para cada amostra uma alíquota de 0,4 mL a cada hora foi retirada para análise via CLAE. Para manter o volume do

compartimento receptor constante, a cada retirada de alíquota o mesmo volume de tampão PBS foi adicionado.

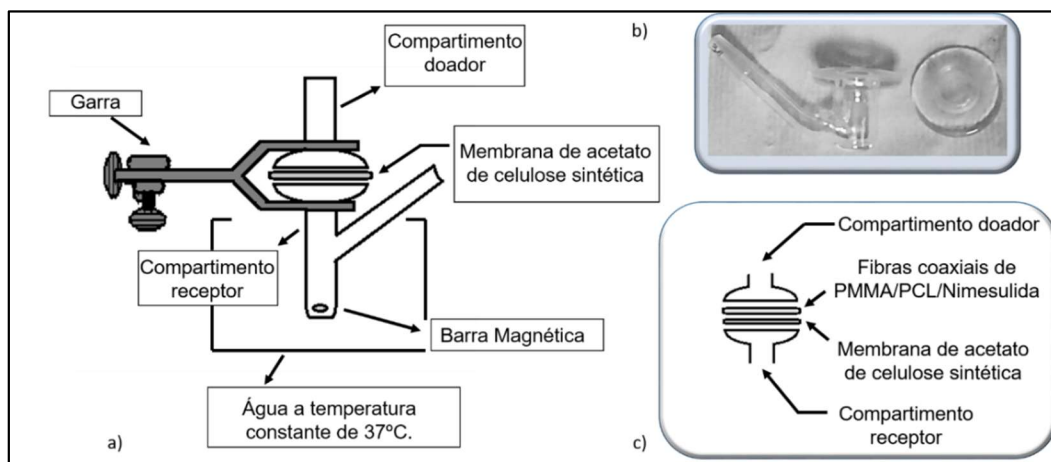


Figure 2.5. a) Representação de um sistema de liberação tipo Franz Cell; b) Imagem do sistema Fraz Cell utilizado; c) Esquema da montagem do sistema de liberação com as fibras utilizadas.

2.4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas para todas os experimentos em que as mesmas se fizeram necessárias, foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prisma 5.0, através do método estatístico One-way ANOVA com um intervalo de confiança de $p < 0,05\%$. Em seguida, para todas os experimentos, foi realizado o pós teste comparativo de Tuckey, em que cada letra sobrescrita nos resultados indica um gupo diferente da análise, sendo considerados significativamente diferentes os grupos com $p < 0.05\%$ (representados com letras diferentes).

CÁPITULO 3
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS
POLIACILHIDRAZONAS

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO-SÍNTESE

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS POLIACILHIDRAZONAS

A síntese das poliacilhidrazonas foi baseada no artigo proposto por Skene e Lehn (SKENE; LEHN, 2004), que relata a síntese de poliacilhidrazonas e suas caracterizações. Foram planejadas as sínteses de duas acilhidrazonas, das quais a formação está apresentada na Figura 3.1. A formação da acilhidrazona **5A** é inédita e baseada em uma tentativa de aumentar a solubilidade do polímero pela diminuição da cadeia alifática, uma vez que os autores relatam baixa solubilidade de um polímero similar com uma cadeia alifática maior (SKENE; LEHN, 2004). A acilhidrazona representada como **5B** já havia sido descrita por Skene e Lehn, porém sem utilização deste polímero em demais aplicações.

Inicialmente, foram sintetizados os diésteres correspondentes aos diácidos carboxílicos comerciais (**1a** e **1b**) mediante reação de esterificação de Fischer utilizando metanol em catálise ácida. Em seguida, os diésteres **2a** e **2b** foram submetidos à reação de hidrazinólise (hidrato de hidrazina 80 % em metanol) para gerar as dihidrazidas correspondentes (**3a** e **3b**). Finalmente, a formação dos polímeros de acilhidrazonas **5A** e **5B** ocorreu mediante reações de acoplamento ácido-catalisadas entre os dialdeídos funcionalizados (**4a** e **4b**) e as respectivas dihidrazidas.

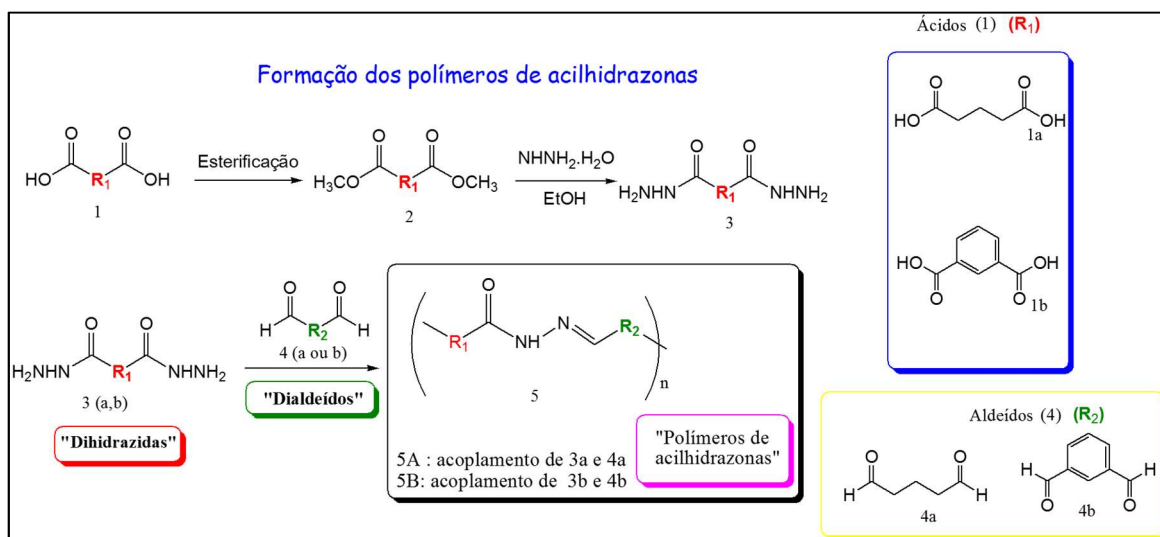


Figura 3.1. Representação da formação geral das poliacilhidrazonas.

3.1.1 Etapa de formação dos ésteres: reações de esterificação de Fischer

Inicialmente, para obtenção do éster **2a**, foi realizada a esterificação de Fischer, conduzida através da reação dos ácidos **1a** e **1b** catalisada por ácido sulfúrico em metanol como solvente (SOLLADIE; ZIANICHERIF, 1993). O mecanismo da reação de esterificação para obtenção do éster **2a** sugere a substituição nucleofílica no grupo acila nas duas carbonilas do ácido, seguida de eliminação, como exemplificado (em apenas uma das carbonilas) na Figura 3.2.

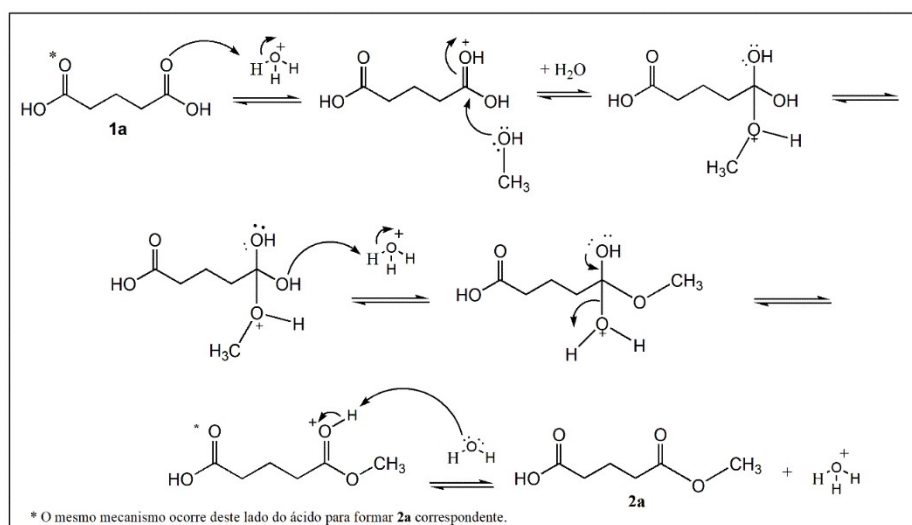


Figura 3.2. Mecanismo da reação de Esterificação de Fischer para formação dos diésteres.

As carbonilas dos ácidos **1a** e **1b** podem ser ativadas para sofrer uma reação de adição nucleofílica mais rápida na presença de um ácido forte como HCl ou H₂SO₄. A presença do ácido mineral favorece o equilíbrio reacional tornando a carbonila mais ativa frente ao ataque pelo álcool, e um excesso de ácido carboxílico aumenta o rendimento reacional (SOLOMONS; FRYHE, 2013). O átomo de oxigênio da carbonila é então protonado pelo ácido mineral, fornecendo uma carga positiva ao ácido carboxílico e tornando-o mais reativo. Posteriormente a formação de uma molécula de água intramolecular (subsequentemente eliminada), leva a formação do éster **2a**. O mesmo acontece para o ácido **2b**.

Para a elucidação estrutural dos ésteres foram realizadas as análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier por reflectância total atenuada (FTIR-ATR), espectrometria de massas por ionização electrospray (EM-ESI) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Para o éster **2a**, inicialmente através da análise de seu espectro de infravermelho (Figura 3.3) pode-se notar a presença de bandas de estiramento (ν) da ligação C-H de 3003 a 2846 cm⁻¹, bem como a ausência da banda serrilhada típica de ν da

ligação O-H referente ao grupamento ácido carboxílico próxima a 3026 cm^{-1} – 2.891 cm^{-1} . Pode-se ainda observar o deslocamento da banda de ν da ligação C=O para o éster em 1732 cm^{-1} , diferente para o ácido original em 1684 cm^{-1} (Figura 16). Notou-se ainda as bandas relativas à deformação angular (σ) da ligação C-H de CH_2 em frequências mais baixas como $1431\text{--}1406\text{ cm}^{-1}$ para o ácido e 1436 cm^{-1} para o éster; bem como a presença da banda dupla de estiramento típico de ésteres para a ligação C-O em 1171 e 1151 cm^{-1} , ausente para o ácido glutárico (**1a**) estando, neste caso, presente apenas uma banda na região de 1201 cm^{-1} . A presença de tais bandas, sugeriram a formação do éster glutarato de dimetila (**2a**).

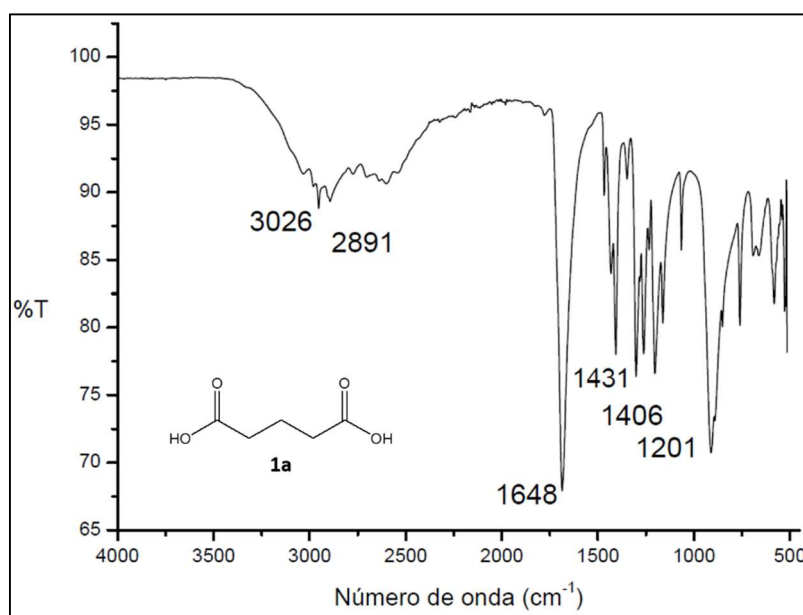


Figura 3.3. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o ácido glutárico **1a**.

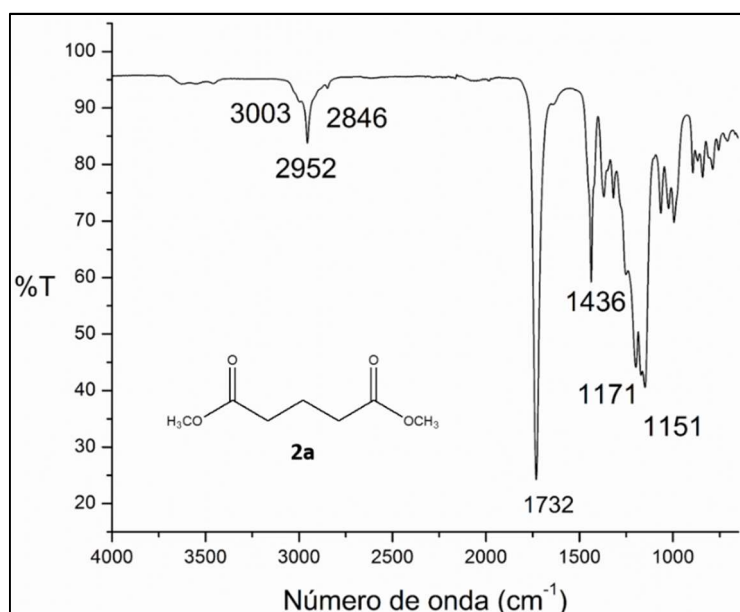


Figura 3.4. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o éster glutarato de dimetila **2a**.

A análise do espectro de massas do composto **2a**, (Figura 3.5) indicou a massa para o éster dimetilglurato de 160 g/mol, sendo apresentada como $[M+Na]$ (183 g/mol) para o espectro de massas por electrospray no modo positivo. Ainda foi possível observar a presença do pico em razão m/z de 343 referente ao [dímero + Na].

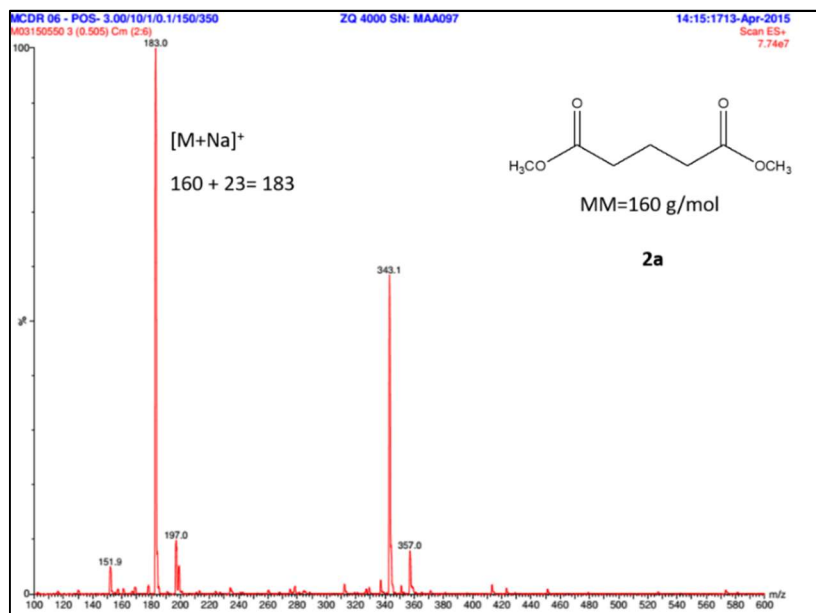


Figura 3.5. Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para o éster glutarato de dimetila **2a**.

O espectro de RMN de ^1H de **2a** (Figura 3.6) foi realizado em DMSO e utilizando o sinal de deslocamento químico (δ) em 3,3 do resíduo de água nesse solvente como referência. Foi observado um simpleto em δ 3,5 com integral referente a 6 átomos de hidrogênio, que foi atribuído aos hidrogênios metoxílicos Ha e Ha'. Também foi observado o sinal referente aos átomos de hidrogênios metilênicos Hb e Hb' (com integral referente a 4 hidrogênios) como um tripleto em δ 2,3 apresentando a constante de acoplamento $J = 7,6$ Hz que desdobram este sinal em um tripleto perfeito. O sinal dos hidrogênios Hc foram atribuídos ao quinteto em δ 1,5 com integral de 2 hidrogênios, que apresentou $J = 7,6$ Hz.

No espectro ^{13}C para o composto **2a** (Figura 3.7), pode-se notar a presença de um sinal em δ 173,3 o qual foi atribuído ao carbono C1 e C1' referente a carbonila do éster; um sinal em δ 51,6 atribuído aos carbonos C3 e C3' mais desblindados devido à proximidade com a carbonila; o sinal atribuído à C4 apresentou um sinal em δ 32,7. Também foi observado um sinal em δ 20,2 atribuído aos carbonos C2 e C2' das metoxilas do éster, sendo este o sinal mais blindado.

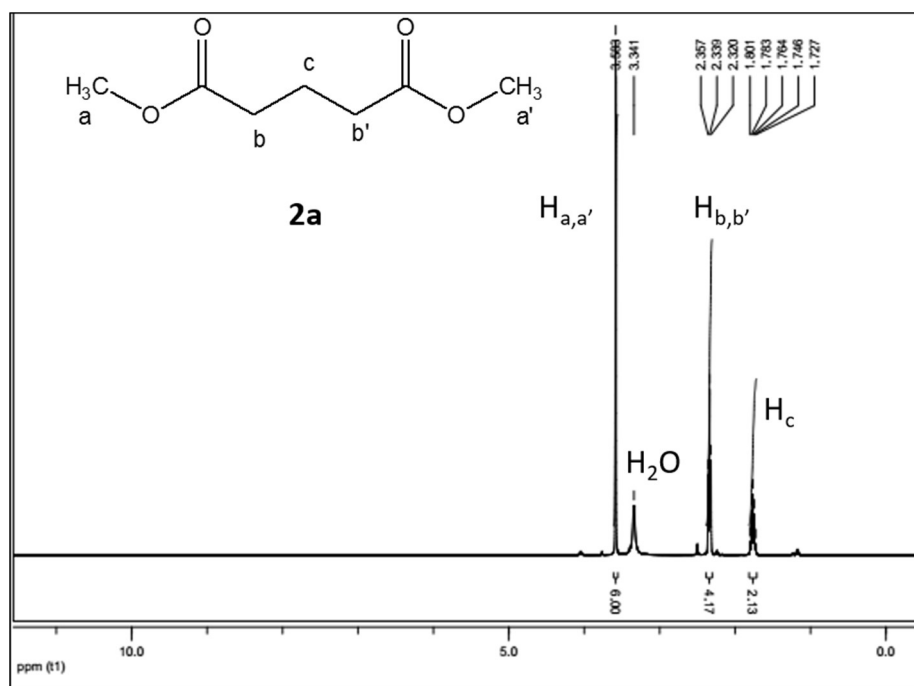


Figura 3.6. Espectro RMN ¹H em DMSO-d₆ para o éster glutarato de dimetila **2a**.

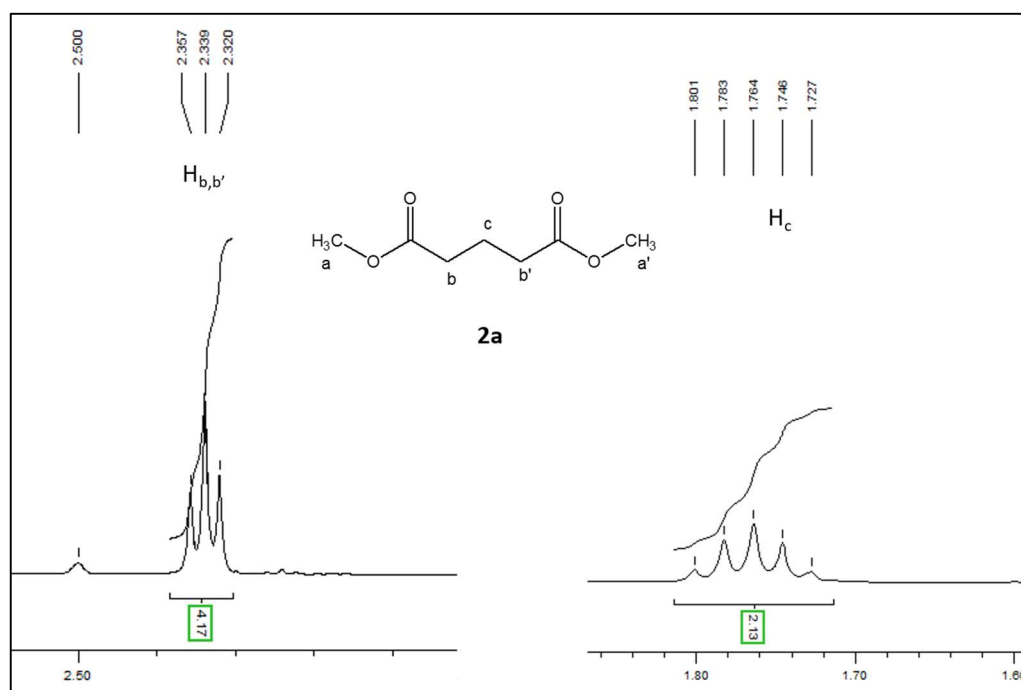


Figura 3.7. Expansão do espectro RMN ¹H para o éster glutarato de dimetila **2a** em DMSO-d₆.

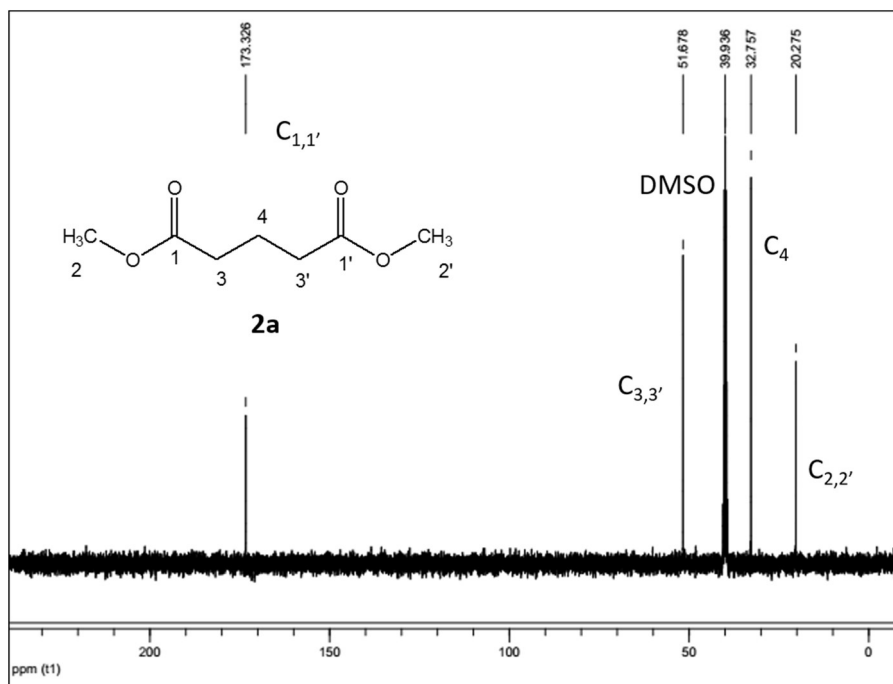


Figura 3.8. Espectro RMN de ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ para o éster dimetilglutato **2a**.

Seguindo o planejamento sintético, para obtenção do éster isoftalato de dimetila **2b**, mediante análise inicial do espectro de infravermelho para este composto (Figura 3.10), pode-se notar a presença de bandas de estiramento (ν) da ligação C-H na faixa de 3099 a 2961 cm^{-1} , bem distintas das bandas largas e intensas relativas ao ν da ligação O-H que sobrepõem ao ν da ligação C-H para o ácido isoftálico, de 3068 a 2554 cm^{-1} (Figura 3.9). Observa-se também a mudança da banda de ν da ligação C=O, para o éster em 1716 cm^{-1} diferente para o ácido original em 1683 cm^{-1} . Notou-se ainda as bandas de deformação angular (σ) da ligação C-H de CH_2 em frequências mais baixas como 1415 cm^{-1} para o ácido e de 1426 cm^{-1} para o éster, bem como a presença da banda dupla de estiramento típico de ésteres para a ligação C-O em 1131 cm^{-1} e 1074 cm^{-1} ausente de forma dupla para o ácido glutárico (**1a**) estando presente apenas uma banda em 1161 cm^{-1} . A presença de tais bandas, sugeriram a formação do éster isoflato **2b**.

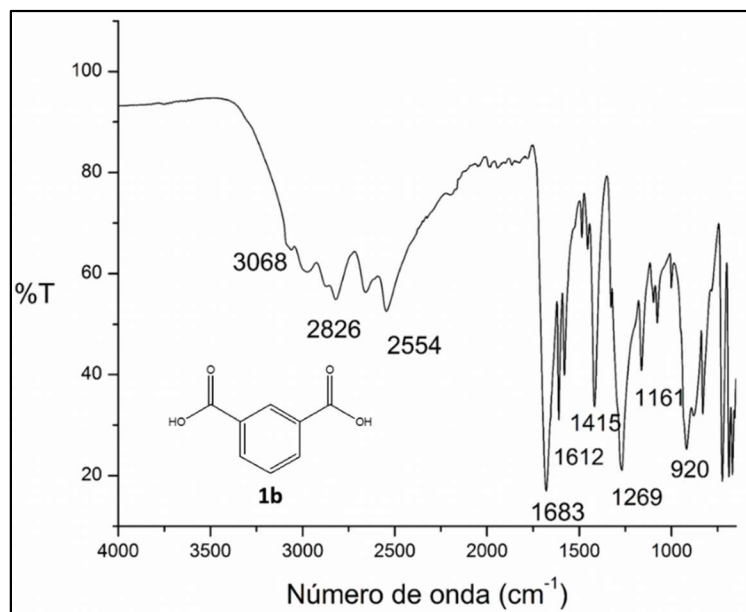


Figura 3.9. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm⁻¹ para o ácido isoftálico **1b**.

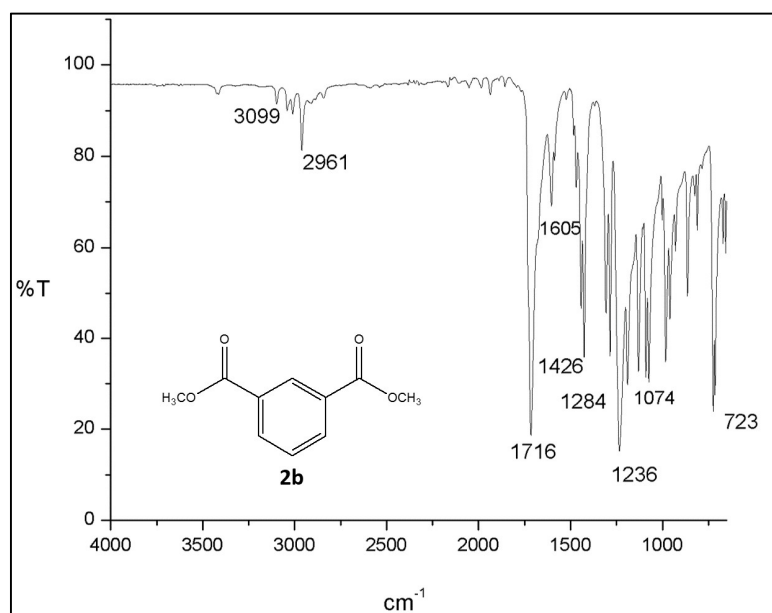


Figura 3.10. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm⁻¹ para o éster isoftalato de dimetila **2b**.

O espectro de massas para o composto **2b** (Figura 3.11) indicou a massa do éster isoftalato de 194 g/mol, apresentado de modo cationizado como $[M+Na]^+$, com razão m/z de 217. Ainda foi possível observar picos de menor intensidade como o de razão m/z 235, 315, 381 e 413 referentes, respectivamente, aos contaminantes *n*-butilbenzenosulfonamida, dibutilsebacato, Triton e diisocetilftalato presentes durante a análise (SUI; YOUNG; WHITTAL, 2008).

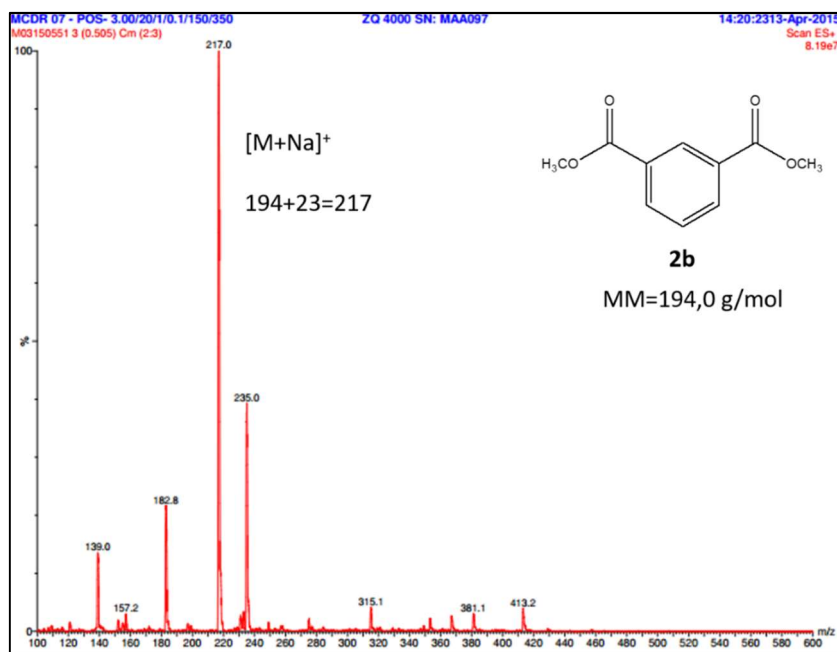


Figura 3.11. Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para o éster isoftalato de dimetila **2b**.

Seguindo a caracterização do éster **2b** foi realizado o espectro de RMN de ^1H utilizando como solvente DMSO e o sinal de deslocamento químico (δ) em 3,3 como o resíduo de água nesse solvente. Foi observado um singlete em δ 3,8 com integral referente a 6 hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios metoxílicos Ha e Ha'. Também foi observado o sinal referente aos hidrogênios aromáticos: Hc como um tripleto em δ 7,6 apresentando $J_b = J_{b'}$ 7,6 Hz. O sinal dos hidrogênios referentes a Hb e Hb' foram atribuídos ao duplete em δ 8,2 e 8,9 que apresentou $J_{vic} = 8,0 \text{ Hz}$. Foi observado também um simpleto com sinal de deslocamento químico δ 8,4 que foi atribuído ao hidrogênio Hd, sendo um dos mais desblindados, juntamente com Hb e Hb', devido ao efeito de ressonância com o anel aromático conforme representado na Figura 3.12 (apenas para um lado da molécula podendo ocorrer, devido a simetria, também do outro lado).

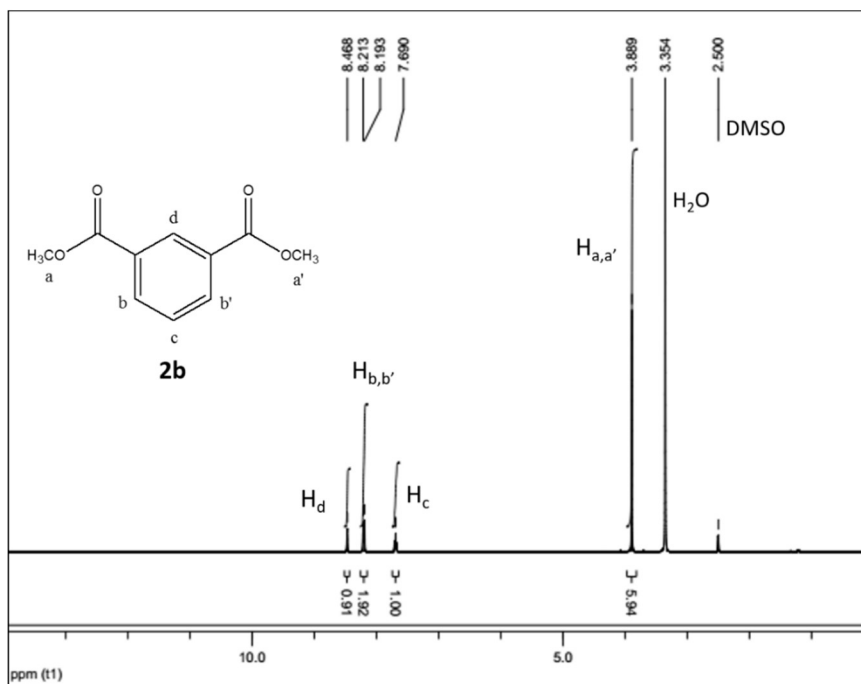


Figura 3.12 Espectro RMN ¹H em DMSO-d₆ para o éster isoftalato de dimetila **2b**.

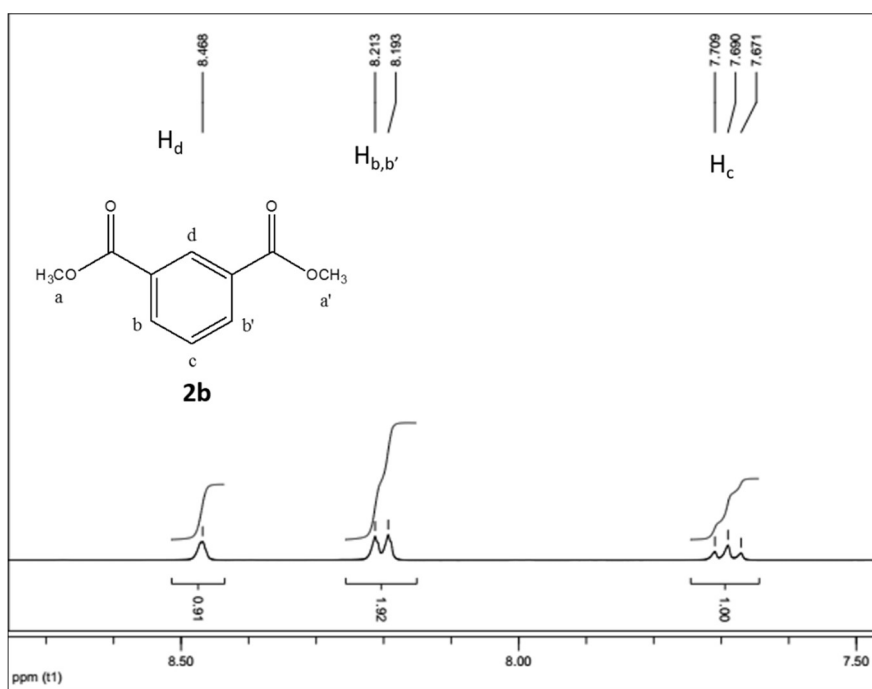


Figura 3.13. Expansão do espectro RMN ¹H para o éster isoftalato de dimetila **2b** em DMSO-d₆.

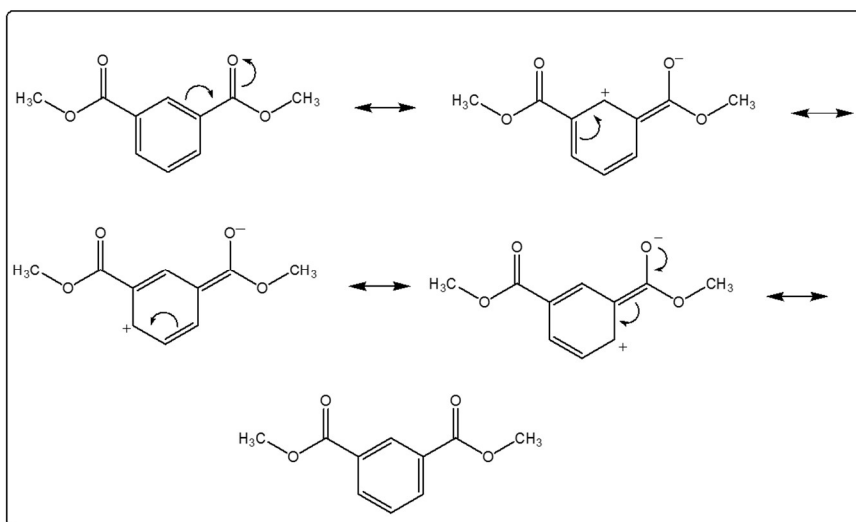


Figura 3.14. Formas canônicas de ressonância para o éster isoftalato de dimetila **2b**.

No espectro ^{13}C para o composto **2b** (Figura 3.15), pode-se notar a presença do sinal mais desblindado do espectro em δ 165,8 o qual foi atribuído aos carbonos C1 e C1' referentes a carbonila do éster; do mesmo modo o sinal mais blindado do espectro em δ 52,9 foi atribuído aos carbonos C6 e C6' das metoxilas. O sinal atribuído aos carbonos C2 e C2' apresentou um deslocamento químico em 134,0 sendo, juntamente com C4 em δ 130,6 o sinal mais desblindado posteriormente à carbonila, devido ao efeito de ressonância do anel aromático. O sinal com δ 130,0 foi atribuído aos carbonos C3 e C3', que apresenta um menor incremento de deslocamento (incremento calculado) devido à seus substituintes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012) quando comparado à C4 (incrementos de deslocamento químico para os substituintes apresentado na Tabela 1). Estes carbonos também podem ser diferenciados pela intensidade que demonstram no espectro: carbonos substituídos levam a uma diminuição na intensidade de seus sinais, uma vez que átomos de carbono sem átomos de hidrogênio ligados apresentam tempos de relaxação maiores, que diminuem a medida que os substituintes alquila são trocados por átomos de hidrogênio, levando a um tempo de relaxação T1 mais longo e consequentemente um Efeito Nuclear Overhauser (NOE) menor, gerando uma menor intensidade deste pico (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). Pela mesma análise foi atribuído o δ em 129,9 para o carbono C5.

Tabela 3.1 Contribuição teórica do substituinte acetato em relação ao anel benzênico para prever os deslocamentos químicos dos átomos de carbono de **2b**.

Anel benzênico (Referência)	C2	C3	C4	C5
δ 128,5	128,5	128,5	128,5	128,5
Incremento (C=O)OCH ₃ no ponto da ligação = δ 2,0	---	2,0	---	---
Incremento (C=O)OCH ₃ no carbono orto = δ 1,2	1,2	---	1,2 + 1,2	---
Incremento (C=O)OCH ₃ no carbono meta = δ -0,1	---	0,1	---	0,1 + (-0,1)
Incremento (C=O)OCH ₃ no carbono para = δ 4,8	4,8	---	---	---
Total de δ	134,5	130,4	130,9	128,3

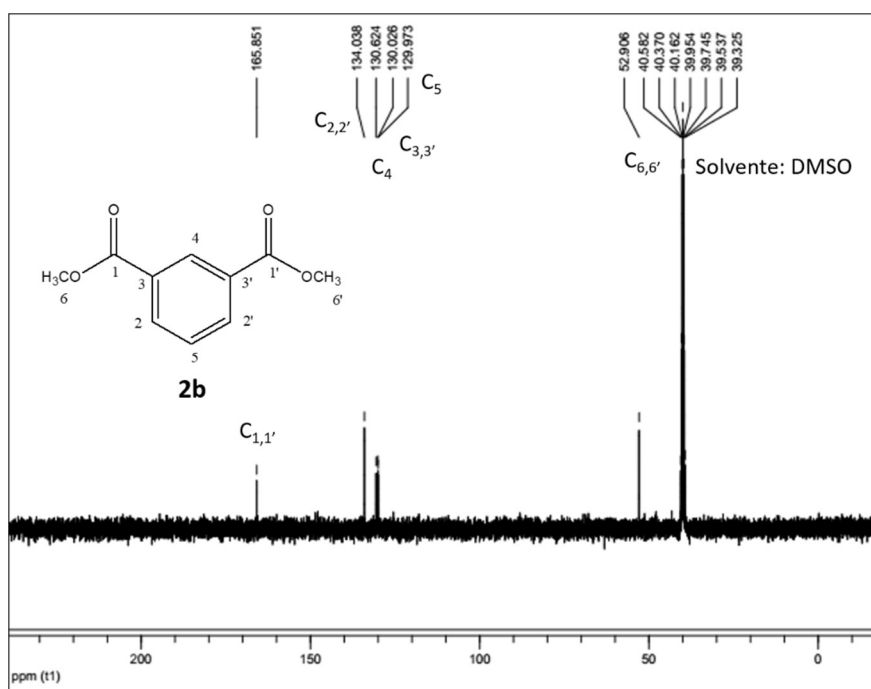


Figura 3.15. Espectro RMN de ¹³C em DMSO-d₆ para o éster isoftalato de dimetila **2b**.

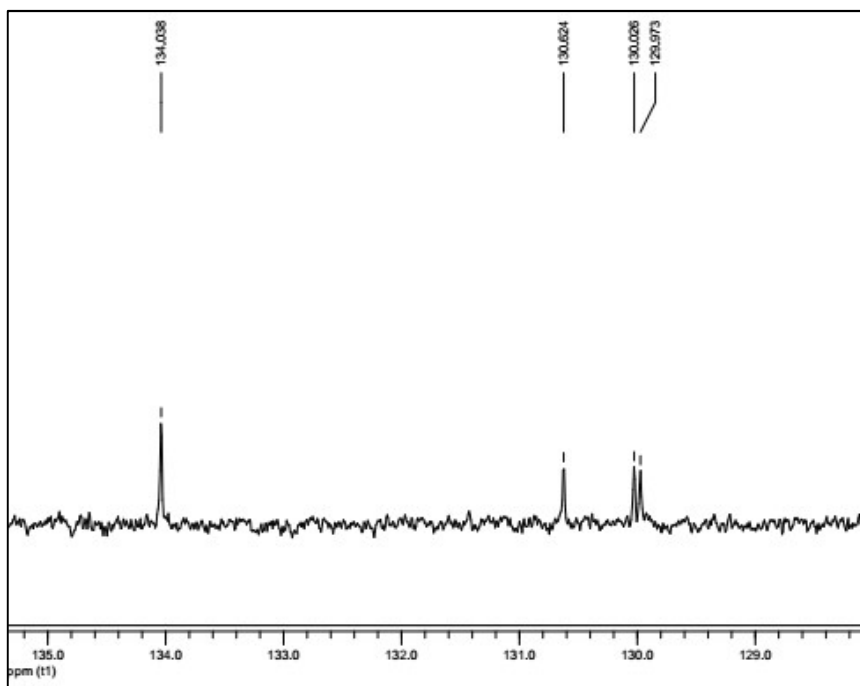


Figura 3.16. Expansão do espectro RMN ^{13}C em DMSO-d_6 para o éster isoftalato de dimetila **2b**.

3.1.2 Obtenção de hidrazidas: reação de hidrazinólise

Seguindo a rota sintética para obtenção dos polímeros de acilhidrazonas **5A** e **5B** uma segunda etapa foi realizada para obtenção das hidrazidas **3a** e **3b**. A hidrazinólise dos ésteres obtidos anteriormente foi realizada através da metodologia descrita por Duarte (DUARTE *et al.*, 2007). A reação foi realizada com os ésteres em monohidrato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e etanol, durante 4-9 h. O mecanismo para obtenção das hidrazidas baseia-se na adição nucleofílica à carbonila do éster para posterior eliminação do grupo de saída e formação da hidrazida correspondente. O ataque nucleofílico da hidrazina ao carbono carbonílico do éster leva a formação de um intermediário tetraédrico dipolar e a liberação de um grupamento metóxi, que é um bom grupo abandonador, gerando uma hidrazida protonada que tem o átomo de hidrogênio rapidamente abstraído no meio reacional gerando a hidrazida equivalente final. Para todos os diésteres obtidos, observou-se a substituição nos dois grupos das moléculas, gerando as dihidrazidas correspondentes. Na Figura 3.17 está representado (para substituição em apenas um grupo éster da molécula) o mecanismo para a reação.

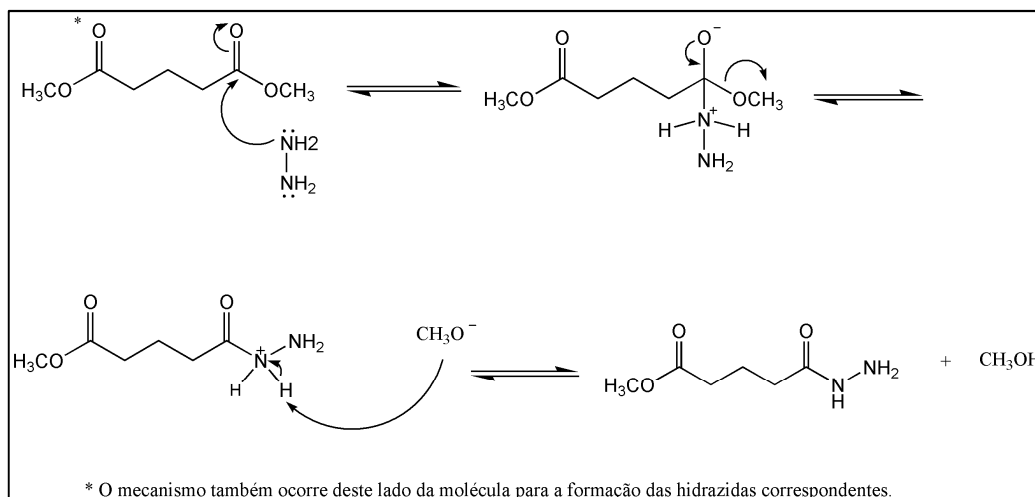


Figura 3.17. Mecanismo de hidrazinólise para formação das dihidrazidas.

Para avaliação da formação da primeira dihidrazida **3a**, através do espectro FTIR-ATR pode-se observar as bandas referentes ao ν assimétrico e simétrico da ligação N-H respectivamente em 3288 e 3179 cm^{-1} (mais deslocada devido a ressonância do grupo hidrazida) e as bandas referentes ao ν da ligação C-H em aproximadamente em 2873 cm^{-1} . Observa-se ainda a banda do estiramento da ligação C=O de amidas (chamada de banda de amida I) em 1630 cm^{-1} e a banda de deformação angular de NH_2 (banda de amida II) em 1531 cm^{-1} . A banda em 1470 cm^{-1} é resultado da interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N. O ν da ligação C-N foi atribuído a banda presente em 1323 cm^{-1} , bem como as bandas decorrentes da deformação angular simétrica fora do plano de N-H. Tais bandas principais podem indicar a formação da hidrazida **3a**.

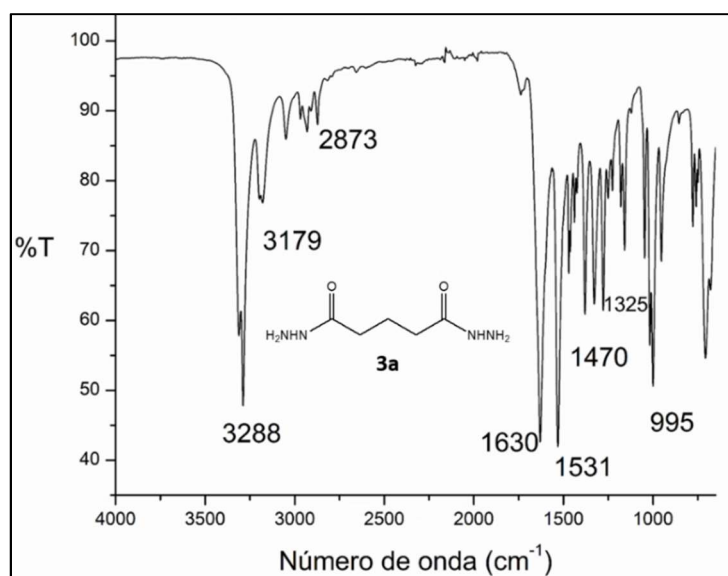


Figura 3.18. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a glutarohidrazida **3a**.

O espectro de massas para a hidrazida **3a** revelou o pico base como $[M+Na]^+$ com razão m/z de 183,0 e a massa molecular do composto foi identificada como MM=160 g/mol. Ainda puderam ser observados picos com razão m/z de 107, 172, 381 e 413 referentes respectivamente as impurezas de polietileno glicol, 4-HCCA e Triton e diisocetilftalato (SUI; YOUNG; WHITTAL, 2008), conforme o espectro apresentado na Figura 3.19.

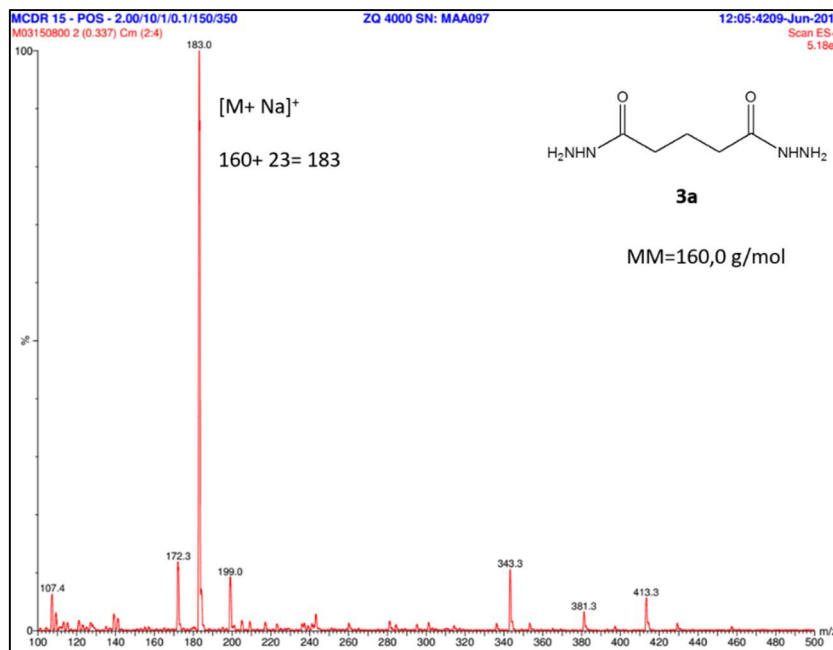


Figura 3.19. Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para a glutarohidrazida **3a**.

Para a completa elucidação estrutural da hidrazida **3a** foram analisados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C para este composto. No espectro de ^1H (Figura 3.20) o sinal em δ 2,4 foi atribuído ao solvente DMSO e o sinal em δ 3,3 ao resíduo de água nesse solvente. Para os átomos de hidrogênio da molécula de glutarohirazida, foi observado um simpleto em δ 8,9 com integral referente a 2 hidrogênios que foi atribuído a Hb e Hb'. O simpleto em δ 4,1 com integral referente a 4 hidrogênios foi atribuído a Ha, Ha'. Para os hidrogênios da cadeia, foi observado um tripleto em δ 1,97 ppm com $J=7,6$ Hz que foi atribuído aos hidrogênios Hc e Hc'. Os hidrogênios Hd e Hd'se apresentaram como um quintupletto com integral referente a 2 hidrogênios e valores de deslocamento químico entre δ 1,7-1,6 ppm. As constantes de acoplamento para este quintupletto foram $J=7,6$ Hz. Na ampliação deste espectro (Figura 3.21) é possível observar sinais bem fracos, como impurezas, referentes ao respectivo éster que não reagiu, porém com integrais muito baixas de aproximadamente 0,02-0,11 em relação aos sinais da hidrazida isolada.

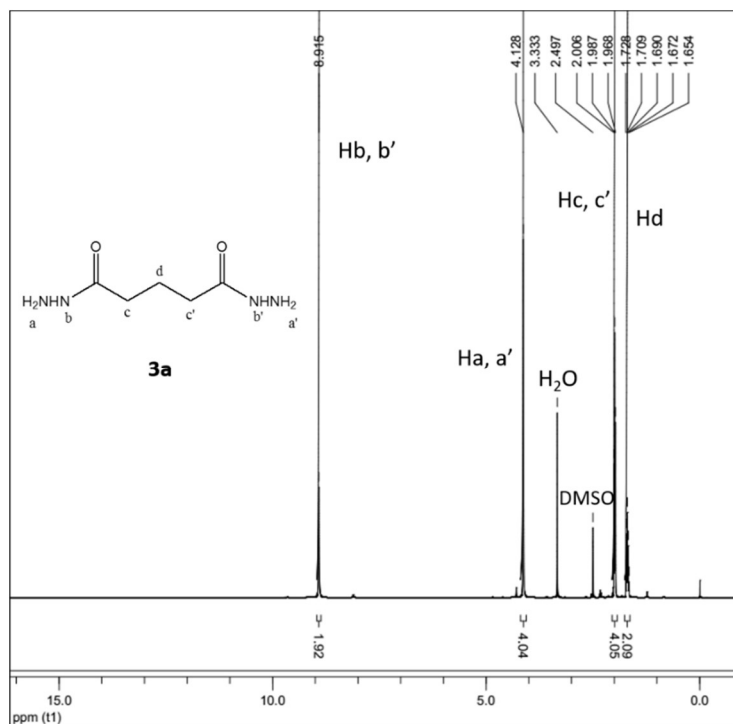


Figura 3.20. Espectro RMN ^1H em $\text{DMSO}-d_6$ para a glutarohidrazida **3a**.

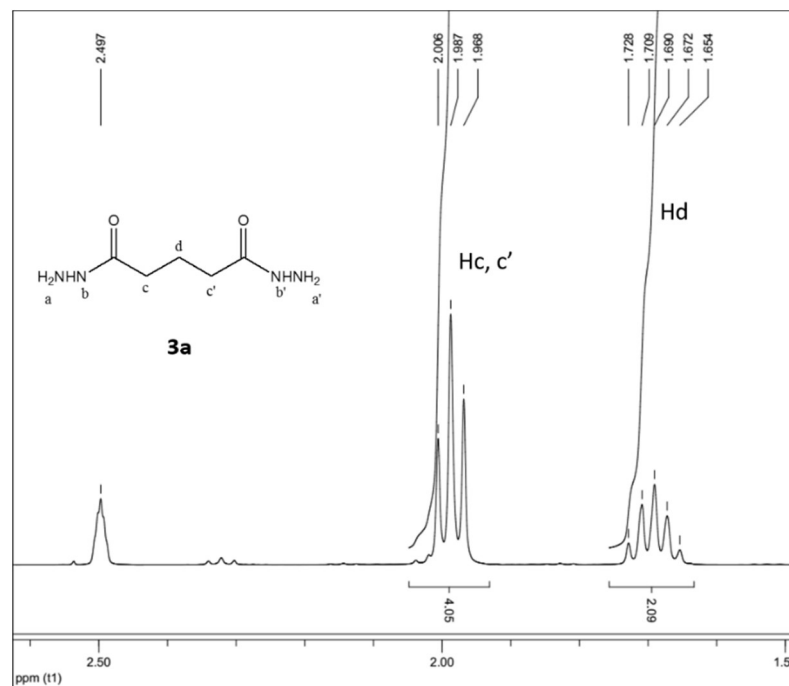


Figura 3.21. Expansão do espectro RMN ^1H em $\text{DMSO}-d_6$ para a glutarohidrazida **3a**.

Avaliando-se o espectro ^{13}C para o composto **3a** Figura 3.22, pode-se notar a presença de um septupletto na região de δ 39,4 referente aos carbonos do dimetilsulfóxido. Um sinal mais desblindado em δ 171,0 foi atribuído aos carbonos C1 e C1' referentes às carbonilas da dihidrazida. Os carbonos C2 e C2' foram atribuídos ao sinal em δ 32,7 mais desblindado devido

ao efeito indutivo dos grupamentos hidrazidas vicinais. O sinal em δ 21,4 foi atribuído ao carbono C3. Tais atribuições puderam inferir na obtenção do intermediário **3a**.

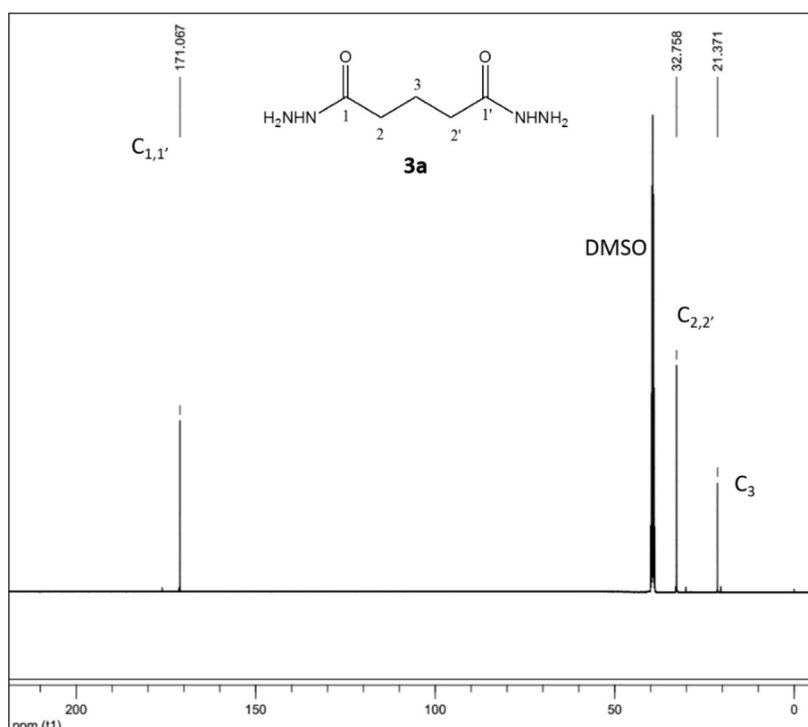


Figura 3.22. Espectro RMN ^{13}C para a glutarohidrazida **3a** em DMSO- d_6 .

Para a formação da segunda dihidrazida **3b**, através do espectro FTIR-ATR (Figura 3.23) pode-se observar a banda referente ao ν da ligação N-H em frequência de 3289 e 3199 cm^{-1} mais deslocada devido a presença do anel aromático; as bandas de ν da ligação C-H do anel aromático aproximadamente em 2847 cm^{-1} . Observa-se ainda a banda referente ao ν da ligação C=O de hidrazidas em 1624 cm^{-1} e a banda de deformação angular de NH_2 em 1524 cm^{-1} que podem se referir também as bandas de estiramento C=C do anel aromático. Pode-se notar também a banda em 1470 cm^{-1} que surge da interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N. A deformação axial da ligação C-N foi atribuída a banda presente em 1323 cm^{-1} . Tais bandas principais podem indicar a formação do hidrazida **3b**.

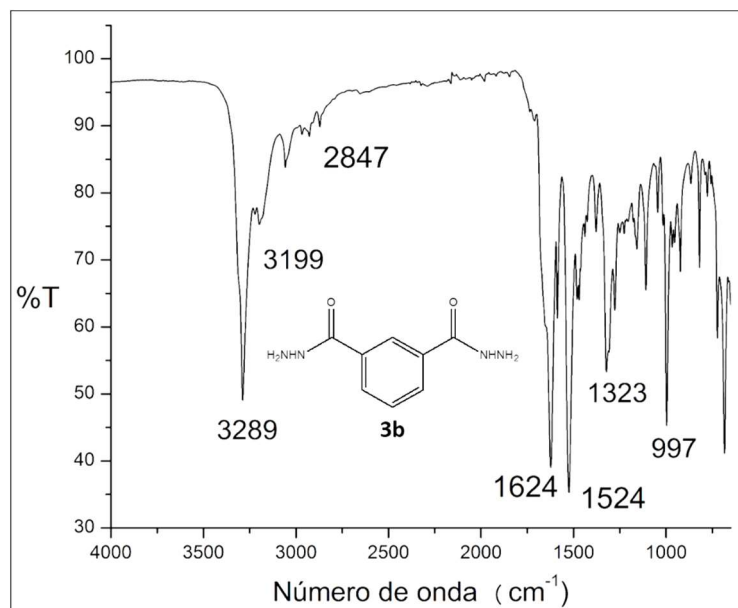


Figura 3.23. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a isoftalohidrazida **3b**.

Seguindo a caracterização de **3b**, a análise do espectro de massas revelou o pico base como $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com razão m/z de 217 e a massa molecular do composto foi identificada como $\text{MM}=194 \text{ g/mol}$ conforme observado no espectro apresentado na Figura 3.24. Ainda foram observadas impurezas no espectro como discutido anteriormente.

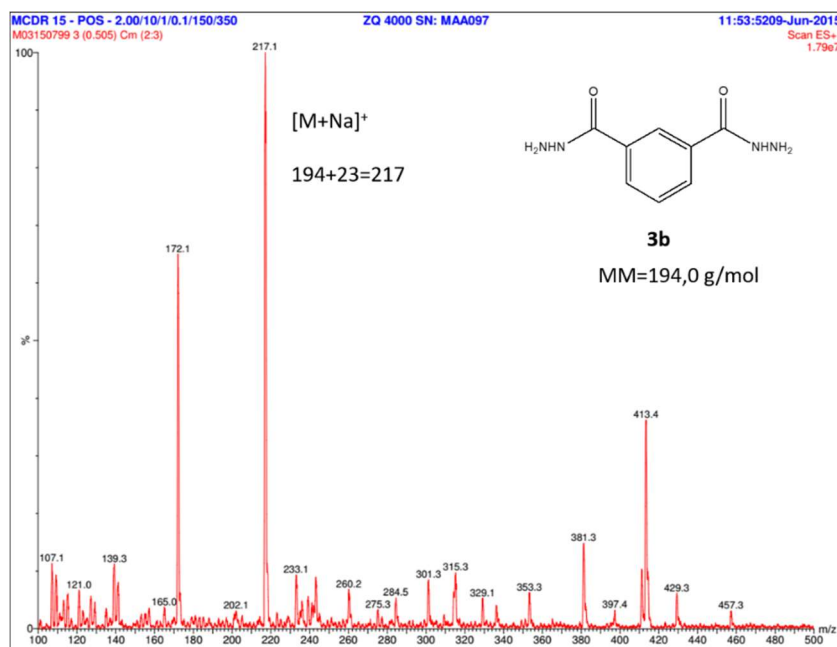


Figura 3.24. Espectro de massas por ionização electrospray no modo positivo para a isoftalohidrazida **3b**.

Completando a elucidação estrutural da hidrazida **3b**, foram analisados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Através da análise do espectro de ^1H (Figura 3.25) o sinal em δ 2,5 foi atribuído ao solvente DMSO e o sinal em δ 3,3 ao resíduo de água nesse solvente. O simpleto em δ 4,5

com integral referente a 4 hidrogênios foi atribuído a Ha e Ha' e o simpeleto em δ 9,8 com integral referente a 2 hidrogênios, foi atribuído a Hb, Hb'. Estes sinais são muito descritos na literatura como, deslocamentos típicos para a subunidade hidrazida (CUNHA *et al.*, 2003). O tripleto com δ em 7.5 foi atribuído a Hd apresentando integral referente a 1 hidrogênio e constante de acoplamento $J = 7,6$ Hz. Os hidrogênios Hc e Hc' são equivalentes e se apresentaram como um duplo dupleto em δ próximos a 7,9 com constantes de acoplamento $J_{orto}=6,0$ Hz e $J_{meta}=1,6$ Hz. Por fim o singleto em δ 8,2 ppm foi atribuído ao hidrogênio He. Ainda na ampliação do espectro citado é possível observar sinais bem fracos, como impurezas, referentes ao respectivo éster isoftalato que não reagiu, porém com integrais muito baixas em relação aos sinais da hidrazida de 0,003-0,005.

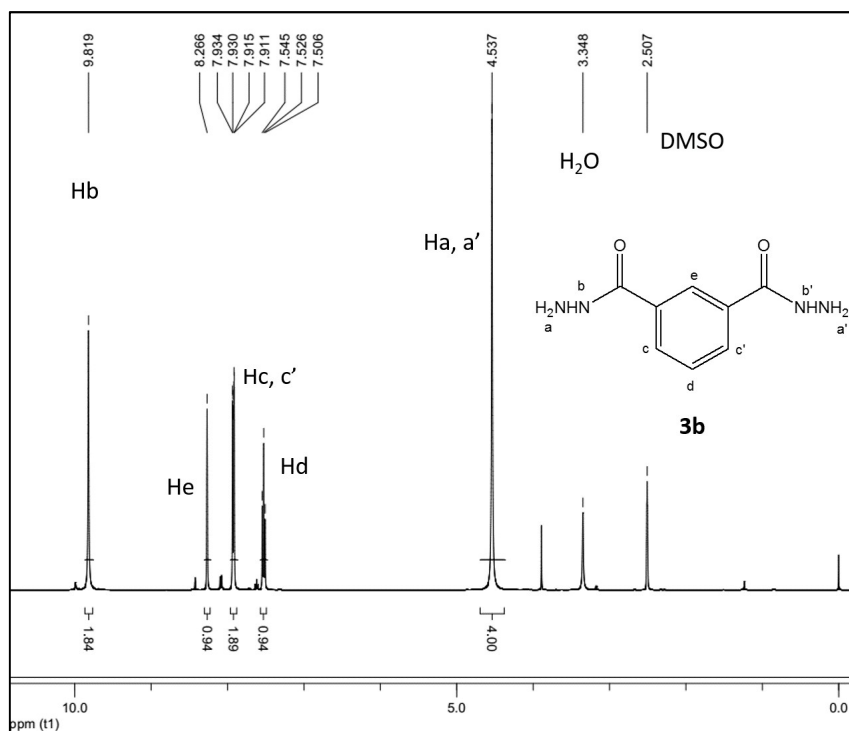


Figura 3.25. Espectro RMN ^1H em $\text{DMSO}-d_6$ para a isoftalohidrazida **3b**.

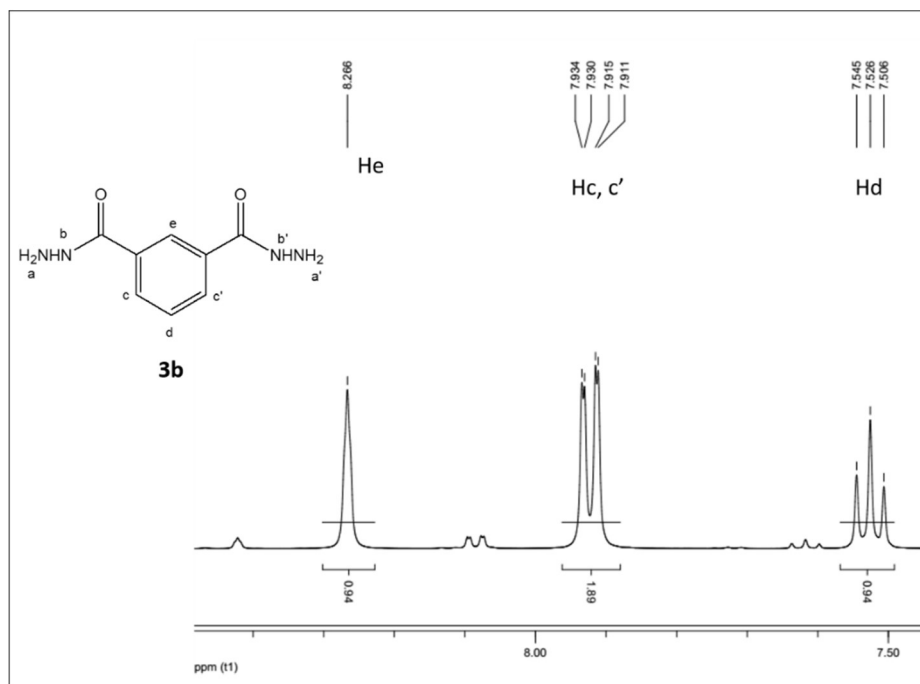


Figura 3.26. Expansão do espectro RMN ^1H para a isoftalohidrazida **3b** em $\text{DMSO-}d_6$.

Avaliando-se o espectro RMN ^{13}C para o composto **3b** (Figura 3.27), pode-se notar a presença de um septupletto na região de δ 39,4 referente aos carbonos do dimetilsulfóxido. Um sinal mais desblindado em δ 165,1 foi atribuído aos carbonos C1 e C1' referentes às carbonilas da dihidrazida a presença de um sinal mais blindado do espectro em δ 52,7 foi observado como impureza das metoxilas de éster residual na hidrazida. Os carbonos C2 e C2' foram atribuídos ao sinal em δ 131,1 mais desblindados devido ao efeito indutivo dos grupamentos hidrazida em posição orto. O sinal em δ 128,9 foi atribuído aos carbonos C3 e C3' mais desblindados pelo efeito de ressonância do anel aromático, bem como o sinal em δ 128,1 ppm foi atribuído ao carbono C4. O sinal em δ 125,7 foi atribuído a C5. Tais atribuições puderam inferir na obtenção do intermediário **3b**.

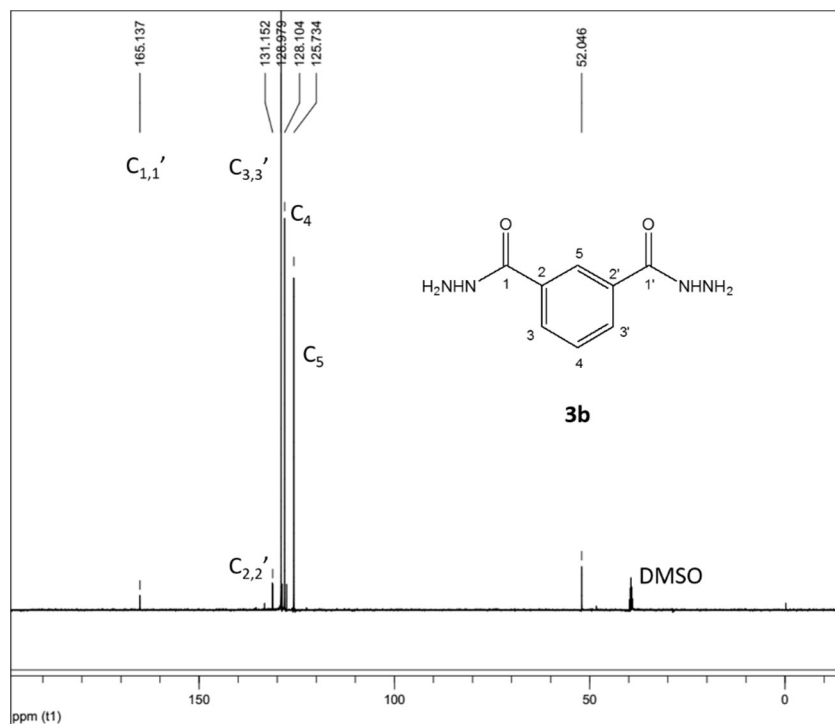


Figura 3.27. Espectro RMN ^{13}C em DMSO-d_6 para a isoftalohidrazida **3b**.

3.1.3 Formação das poliacilhidrazonas: reação de condensação

Após a formação das dihidrazidas intermediárias, foi realizada a última etapa para a síntese das poliacilhidrazonas **5A** e **5B** como descrita na Figura 3.1, sendo essa etapa o acoplamento entre os dialdeídos **4a** e **4b** e as dihidrazidas **3a** e **3b** para formar as poliacilhidrazonas correspondentes. Este método é bem descrito na literatura para a reação de condensação de aldeídos ou cetonas à hidrazinas formando acilhidrazonas (BARREIRO *et al.*, 2002) (CACHIBA *et al.*, 2012), bem como para a formação de polímeros de acilhidrazonas (SKENE; LEHN, 2004). As reações foram feitas a partir do acoplamento das hidrazidas e aldeídos em estequiometria 1:1 em metanol com adição de duas gotas de ácido acético. As reações foram deixadas sob agitação por aproximadamente 8 horas para garantir a total precipitação do produto.

O mecanismo da reação de acoplamento sugere a reação entre o substrato (dialdeído) com o nucleófilo (dihidrazida) para formar as correspondentes poliacilhidrazonas. Na primeira etapa, o par de elétrons do nitrogênio da subunidade hidrazida (atuando como nucleófilo) ataca o carbono eletrofílico da carbonila do aldeído, formando um intermediário tetraédrico dipolar. Em seguida, ocorre a formação e eliminação do grupo de saída água por abstração do hidrogênio intramolecular seguida da protonação em meio ácido. A eliminação da molécula de água seguida da formação da dupla ligação gera a acilhidrazona protonada, que sofre desprotonação

(por água para regenerar o ácido catalítico ou pela base conjugada do ácido acético) formando o produto final. Como as moléculas apresentam duas subunidades passíveis de sofrerem a reação de substituição (além da reação ser continuada para a formação do polímero), por maior facilidade, na Figura 3.28 foi mostrada apenas uma subunidade.

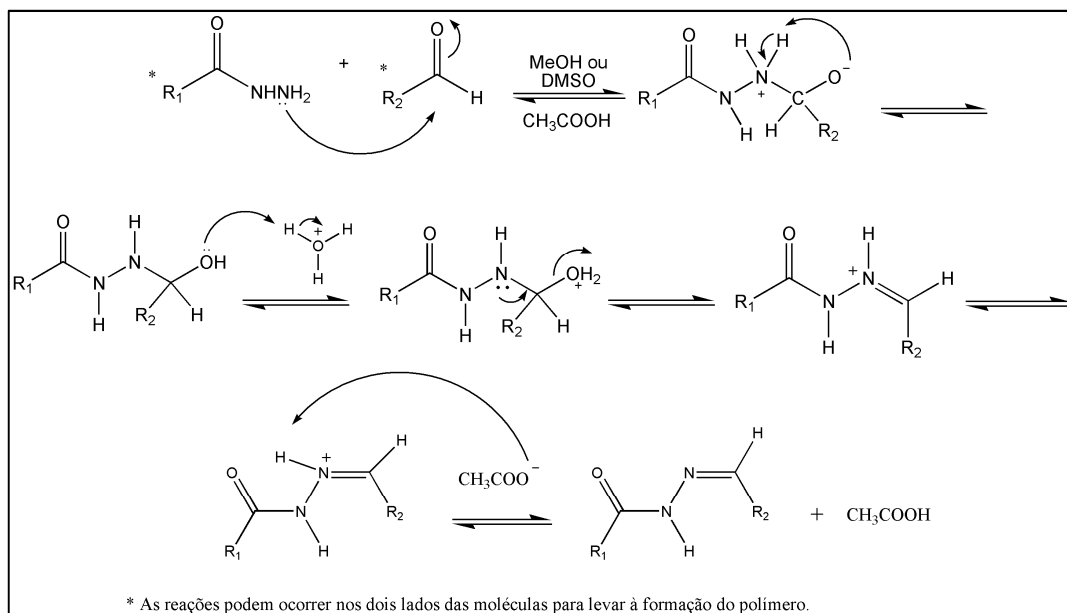


Figura 3.28. Mecanismo da reação de acoplamento entre as dihidrazidas e dialdeídos para formarem as poliacilhidrazonas.

Para a síntese dos dois possíveis polímeros propostos foi possível observar, de forma qualitativa que as poliacilhidrazonas formadas são praticamente insolúveis nos solventes orgânicos mais usuais, dos quais podemos destacar metanol, etanol, acetona, hexano, clorofórmio; e parcialmente solúveis em tetrahydrofurano e N-N-dimetilformamida. O polímero **5A** apresenta pouquíssima solubilidade em DMSO e o polímero **5B** é parcialmente solúvel em DMSO após ultrasonificação. O resultado da baixa solubilidade já era esperado conforme descrito pela literatura (SKENE; LEHN, 2004), porém ambos puderam ser caracterizados após uma solubilização parcial em DMSO. Para os dois polímeros sintetizados, haviam a possibilidade da formação de isômeros *E* e *Z* na configuração da instauração imínica e do tautômero *azo cetona* com a hidrazona, como representado na Figura 3.29. Porém, foi possível observar a predominância de apenas um isômero para cada possível polímero, com base na análise de relatos da literatura (BARREIRO *et al.*, 2002) como a presença de bandas intensas no espectro de infravermelho para o ν da ligação N-H (que não indica a formação do tautômero) e a presença de sinais bem definidos nos espectros de ^1H e ^{13}C correspondente ao C-H imínico que excluiu a forma tautomérica e ainda ajudou a definir os isômeros *E* para os dois polímeros, uma vez que os sinais de deslocamento químico nos espectros não se encontram duplicados

indicando a presença de apenas um isômero. Essa conclusão foi realizada com base na proposição de um ataque a face *Si* do carbono pró quiral do aldeído gerando o produto *E* com menor repulsão eletrônica entre seus substituintes, sendo então mais favorável a obtenção deste isômero. Em todas as representações aqui descritas para os possíveis polímeros **5A** e **5B** estes se encontram na configuração *E* para a ligação imínica. Apesar das análises abaixo indicarem a obtenção do acoplamento, ainda não é possível se concluir a obtenção de polímeros ou apenas monômeros desse acoplamento.

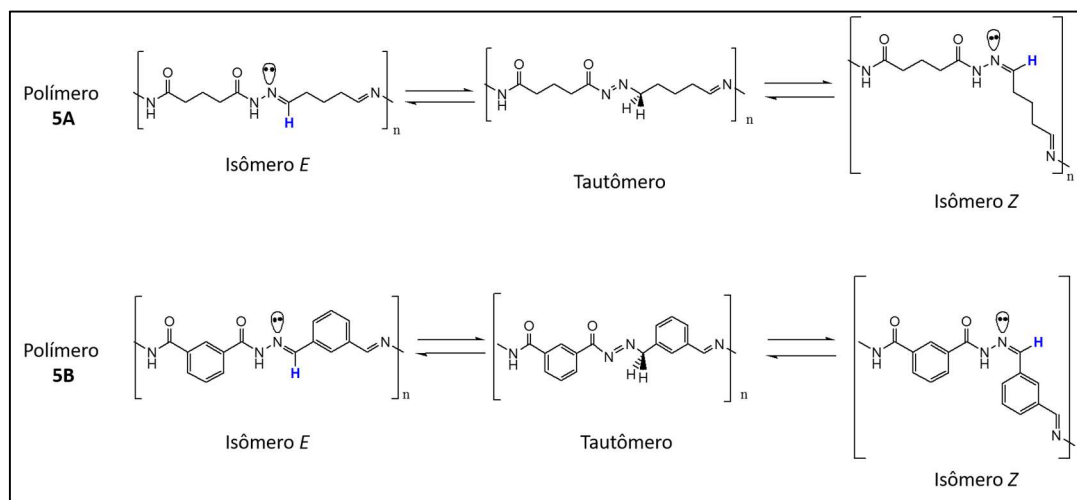


Figura 3.29. Representação dos possíveis isômeros na subunidade imínica para os polímeros **5A** e **5B**.

O primeiro acoplamento foi realizado entre glutarohidrazida (**3a**) e o glutaraldeído (**4a**) para a formação da poliacilhidrazona **5A**. A análise do espectro de IV obtido para o composto **5A** apresentou as bandas de ν da ligação N-H em 3400 e 3270 cm^{-1} , de forma dupla possivelmente devido à distinção das duas ligações N-H presentes no monômero. Também nessa região é possível observar a presença de bandas referentes ao ν C-H alifático entre 3049 e 2936 cm^{-1} . Ainda foram observadas as bandas em 1655 cm^{-1} referente ao ν C=O da acilidrazona; a banda de ν C=N em 1547 cm^{-1} e a banda de combinação entre a deformação angular de N-H e o estiramento da ligação C-N entre 1436 e 1404 cm^{-1} . Notou-se ainda a ausência da banda em 1715 cm^{-1} referente ao ν da ligação C=O do glutaraldeído utilizado, fato que indicou a possibilidade do acoplamento entre a hidrazida **3a** e o aldeído **4a**.

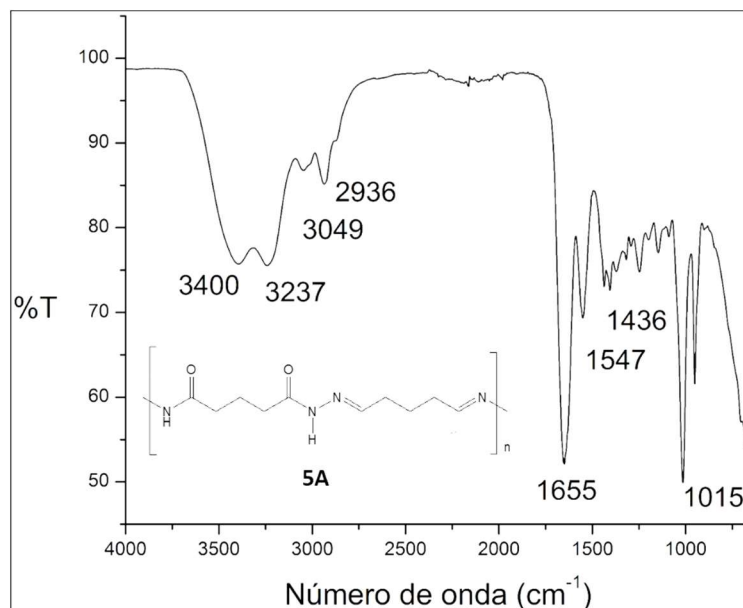


Figura 3.30. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a poliacilhidrazona **5A**.

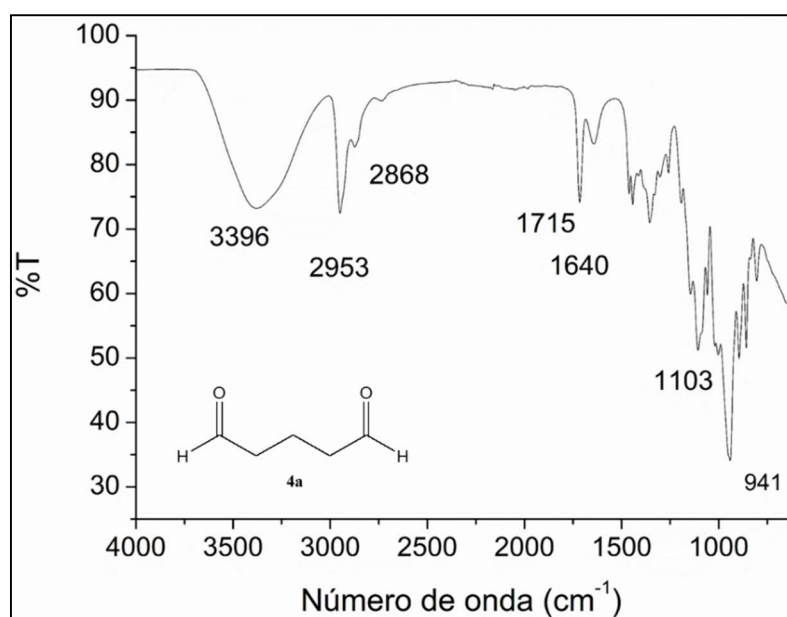


Figura 3.31. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para o aldeído **4a**.

Continuando a caracterização da possível poliacilhidrazona **5A**, foram realizadas as análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H , ^{13}C bem como as análises de RMN por *Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT-135) e análises bidimensionais como *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC), *Heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC). O possível polímero **5A** se apresentou ao final da reação como um filme plástico depositado em toda a extensão do balão reacional (característica muito comum na obtenção de materiais poliméricos) sendo muito pouco solúvel em DMSO tornando

assim difícil sua caracterização. Entretanto, apesar de seus fracos sinais no espectro, este polímero foi comparado à literatura uma vez que a publicação descrita por Lehn em 2004 (SKENE; LEHN, 2004).

A análise do espectro de RMN de ^1H para o monômero demonstrou picos coalescentes típicos para a formação polimérica. Um simpleto em δ 10,8 com integral referente a 1 hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio do grupamento acilhidrazônico He e um simpleto próximo, em δ 10,7 foi atribuído ao hidrogênio Ha da extremidade do monômero. Os hidrogênios Hf e Hj foram atribuídos aos sinais em δ 7,4 e 7,2 respectivamente. Aos hidrogênios da cadeia alifática Hb e Hb', Hd e Hd', Hg e Hg, Hh e Hh' foram atribuídos ao multiplete entre δ 2,2 -2,1 que apresentou integral referente a 14 hidrogênios. Este valor, diferentemente do valor esperado de 8 hidrogênios, pode ser atribuído à hidrogênios de hidrazida ou aldeído residuais, uma vez que o polímero precipitou ao final da reação e pode ter carregado as impurezas na formação do precipitado que, devido a sua baixa solubilidade e formação do filme, não pode ser purificado. Este fato também foi observado no multiplete em δ 1,7- 1,6 com integral referente a dez hidrogênios, que foi associado aos hidrogênios Hc e Hc' e Hi e Hi' mais blindados que o restante de sua cadeia alifática, o qual deveria ser associado a uma integral de 4 hidrogênios, mostrando novamente a presença de impurezas. Estas impurezas foram por fim comprovadas pela presença dos sinais próximos a δ 9,6 associado o hidrogênio do aldeído residual e pelo sinal em δ 8,9 atribuídos aos hidrogênios do grupo $-\text{NH}$ de hidrazida residual.

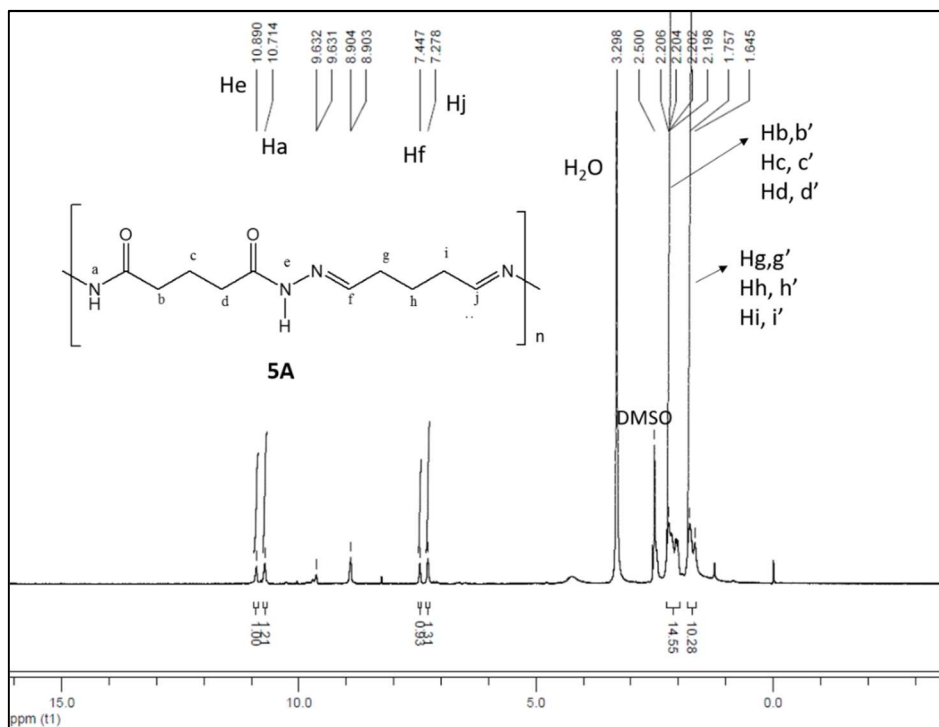


Figura 3.32. Espectro RMN ^1H em DMSO-d_6 a 400 MHz para a poliacilhidrazona **5A**.

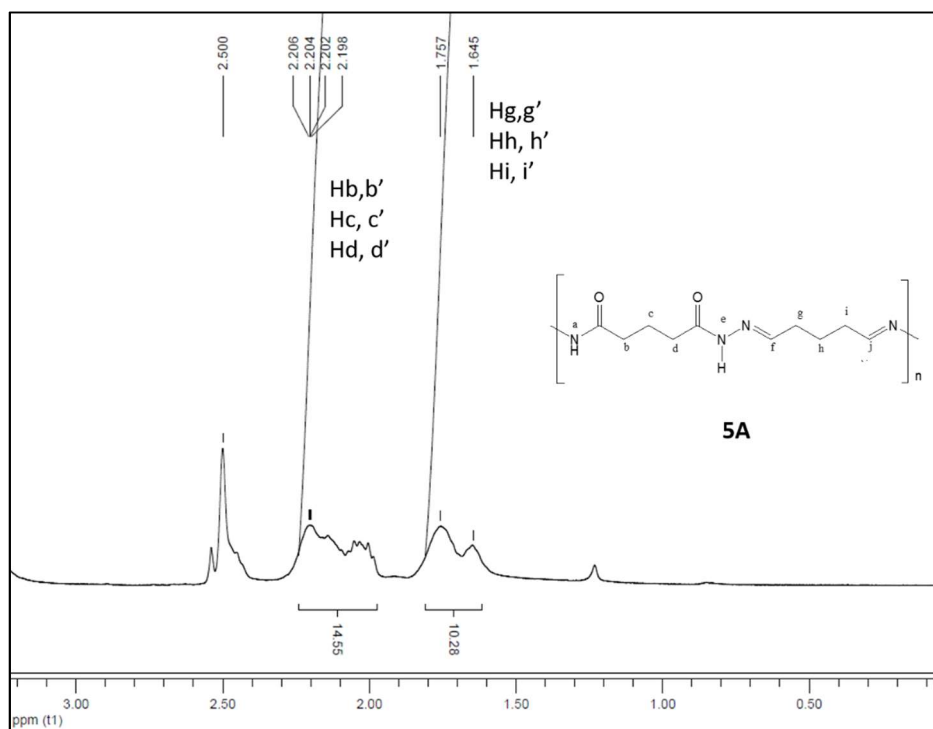


Figura 3.33. Expansão do espectro RMN ^1H para a poliacilhidrazona **5A** em DMSO-d_6 .

Para a caracterização dos carbonos de **5A** foram realizadas as análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C e DEPT-135, bem como as análises bidimensionais, para que em conjunto, essas técnicas pudessem caracterizar o possível polímero. A análise do espectro de ^{13}C e DEPT -135 permite a identificação dos carbonos presentes no polímero. Os

sinais no espectro de ^{13}C referentes a δ 171,0 e 167,6 foram atribuídos as carbonilas C1 e C5 respectivamente, que não demonstraram sinal no DEPT por não serem grupamentos-CH, -CH₂ OU -CH₃, e nem no HSQC por não apresentarem átomo de hidrogênio diretamente ligado. Os sinais presentes no espectro DEPT em δ 149,9 e 146,5 (apresentados como carbonos de grupamentos -CH ou -CH₃) foram atribuídos aos carbonos C6 e C10 respectivamente. Apesar de não serem vistos no espectro RMN ^{13}C , suas correlações são nítidas espectro HSQC entre os carbonos C6 e C10 e seus respectivos hidrogênios, H6 e H10. Os carbonos de -CH₂ da cadeia alifática (C2-C4 e C7-C9) (identificados no DEPT) foram diferenciados através da correlação no espectro HSQC: os sinais que apresentaram no ^{13}C δ 33,2; 32,7 e 31,1 demonstraram correlação com os hidrogênios Hb, Hc e Hd e foram, portanto, atribuídos aos carbonos C2-C4 (estes não podem ser diferenciados uma vez que seus hidrogênios respectivos também não foram). Do mesmo modo, o sinal mais blindado do espectro em δ 23,3; 21,2 e 20,1 foram atribuídos aos carbonos C7-C9. Ainda é possível observar, em análise do espectro DEPT, a presença de sinais da carbonila do aldeído respectivo em δ 195,7 e da hidrazida em δ 184,9 que ajudam a confirmar a presença dos materiais de partida (aldeído e hidrazida) no polímero final. O sinal em δ 79,0- 78,4 foram atribuídos a carbonos de clorofórmio e o sinal em δ 40,3 aos carbonos de dimetilsulfóxido. A presença de DMSO na amostra pode resultar do residual presente na etapa anterior de acoplamento devido à dificuldade da retirada deste solvente do meio.

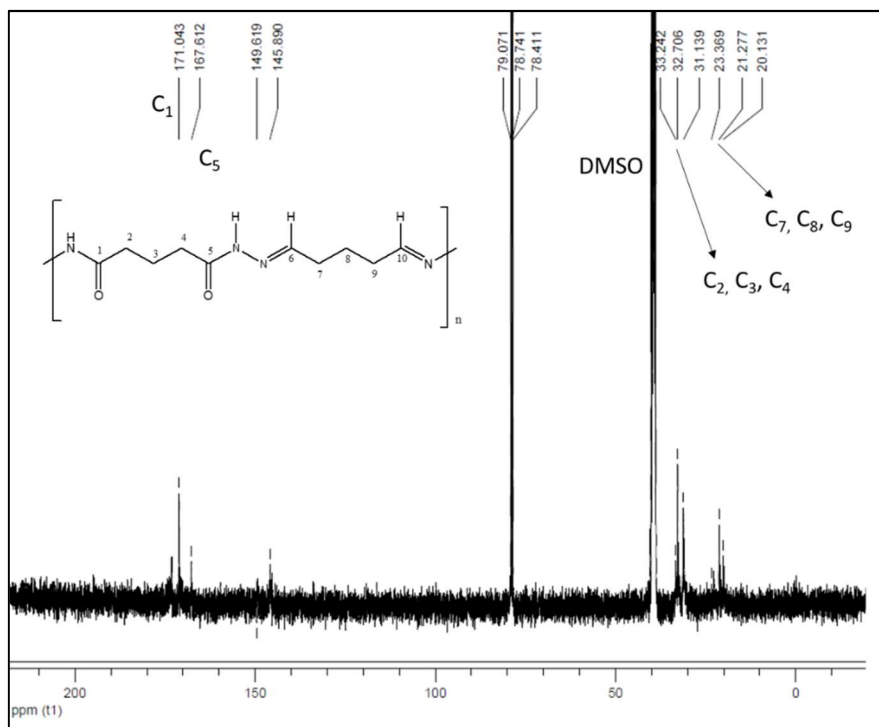


Figura 3.34. Espectro RMN ^{13}C para a poliacilhidrazona **5A** em DMSO-d_6 .

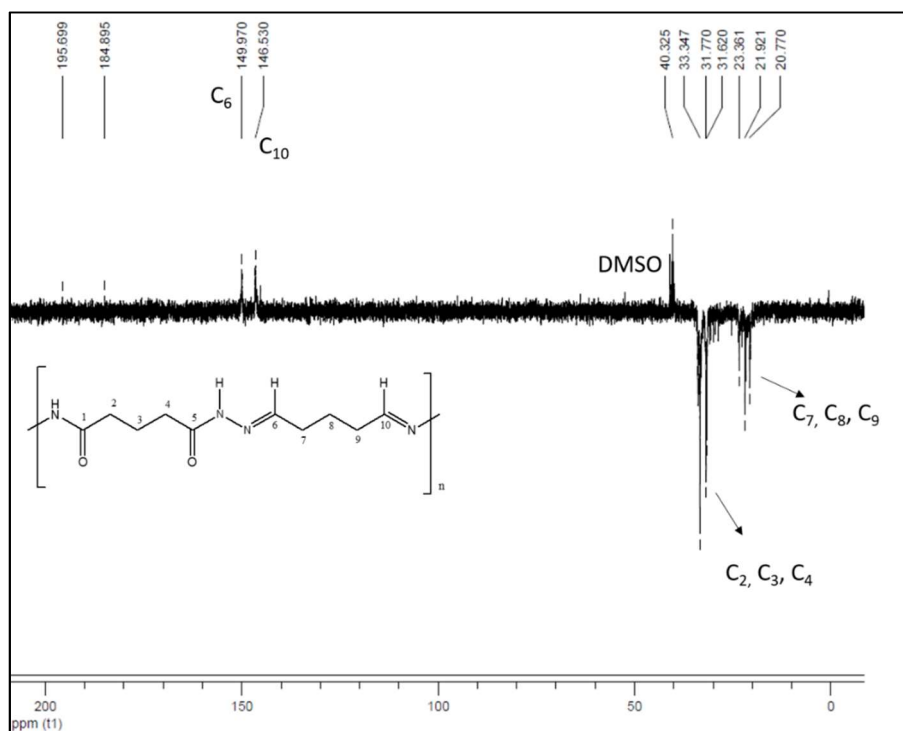


Figura 3.35. Espectro DEPT-135 para a poliacilhidrazona **5A** em DMSO-d_6 .

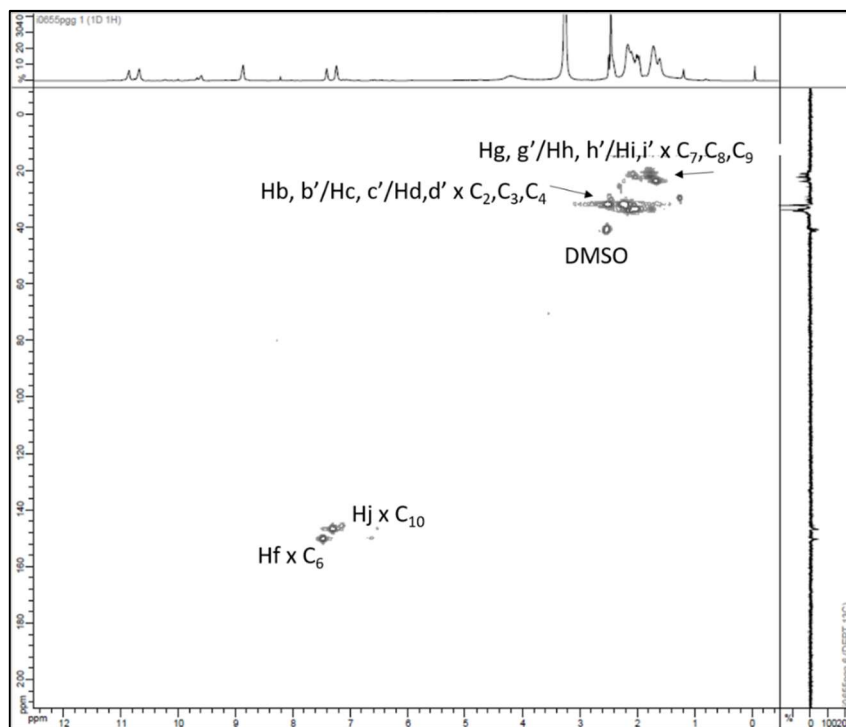


Figura 3.36. Espectro HSQC $^1\text{H}/\text{DEPT}$ para a poliacilhidrazona **5A** em $\text{DMSO}-d_6$.

Iniciando-se a caracterização da possível poliacilhidrazona **5B** foi realizado a análise dos espectros de FTIR-ATR que apresentaram as bandas entre 3400 e 3236 cm^{-1} para os estiramentos da ligação N-H, possivelmente diferenciando os grupos $-\text{NH}$ para o monômero. Também nessa região é possível observar a presença da banda referente ao $\nu\text{ C-H}$ aromático em 3064 cm^{-1} . Ainda foram observadas as bandas em 1648 cm^{-1} referente ao $\nu\text{ C=O}$ da acilidrazona e a banda de $\nu\text{ C=N}$ em 1549 cm^{-1} . Estas bandas ajudam a indicar a possibilidade do acoplamento e a possível formação de **5B**.

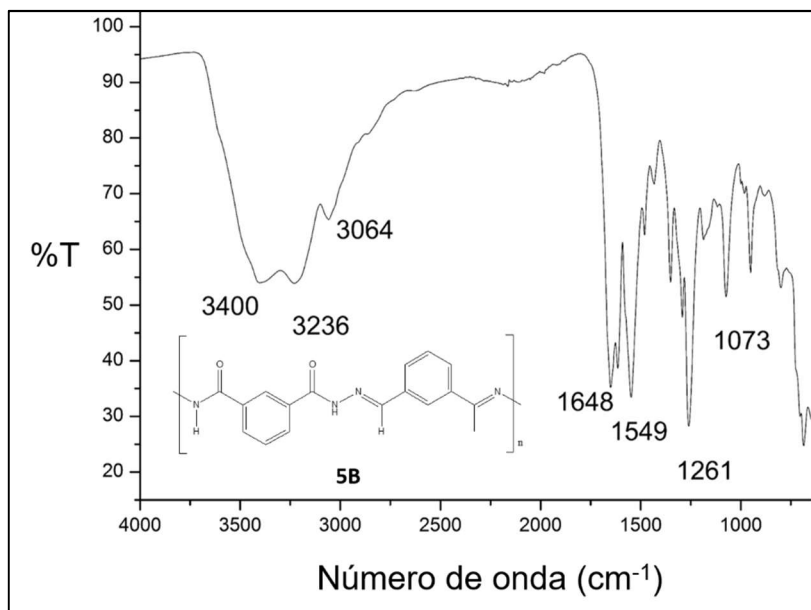


Figura 3.37. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} para a poliacilhidrazona **5B**.

Na análise do espectro de RMN ^1H para o monômero de **5B** pode ser observado um singlete em δ 12,1 com integral referente a 2 hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios ligados ao nitrogênio do grupamento acilhidrazona Ha e He, mais desblindados devido a ressonância causada pela presença do anel aromático. Os hidrogênios Hf e Hj foram atribuídos ao sinal de δ 8,5 com integral referente a 2 hidrogênios, sendo assim atribuído devido a sua falta de correlação direta no espectro HSQC, como visto adiante. Os hidrogênios dos anéis aromáticos se apresentaram na região de δ 8,4 a 7,5 com integral dessa região referente a 8 hidrogênios, como esperado. O sinal em δ 8,4 foi atribuído ao hidrogênio Hd; os hidrogênios Hb e Hb' e Hh foram atribuídos aos sinais em δ 8,15 e 8,14 com integral referente a 3 hidrogênios. Aos hidrogênios Hg e Hg' foi atribuído o sinal em δ 7,7 que apresentou integral referente a 2 hidrogênios. Os hidrogênios Hc e Hi foram atribuídos aos sinais em δ 7,7 e 7,5 respectivamente. Tais atribuições podem também ser comprovadas pelos demais espectros apresentados.

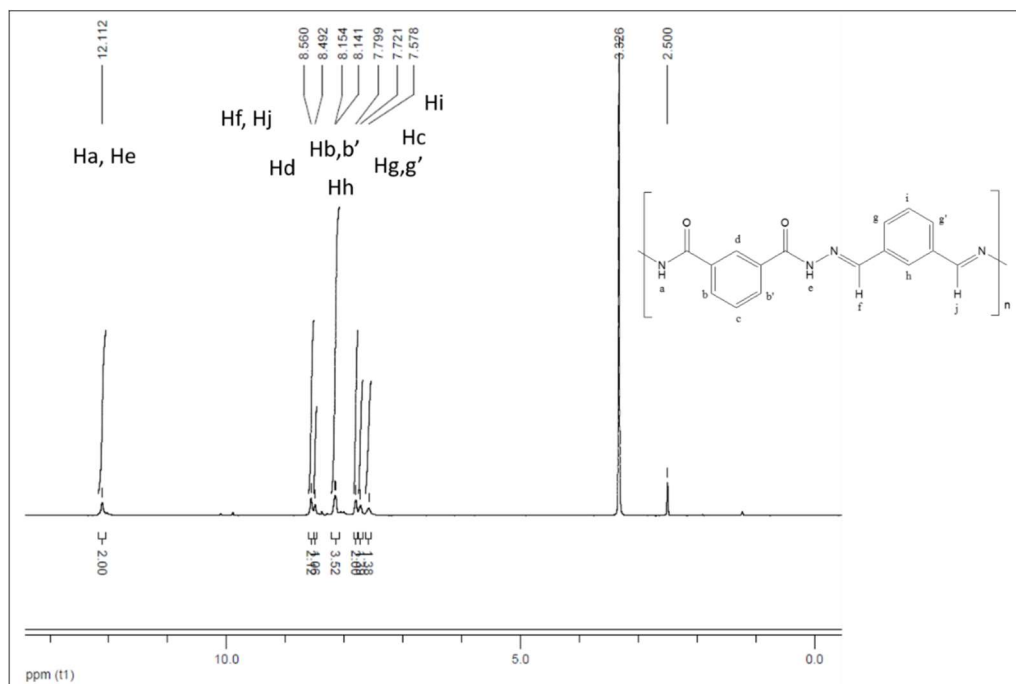


Figura 3.38. Espectro RMN ^1H em DMSO-d_6 a 400 MHz para a poliacilhidrazona **5B**.

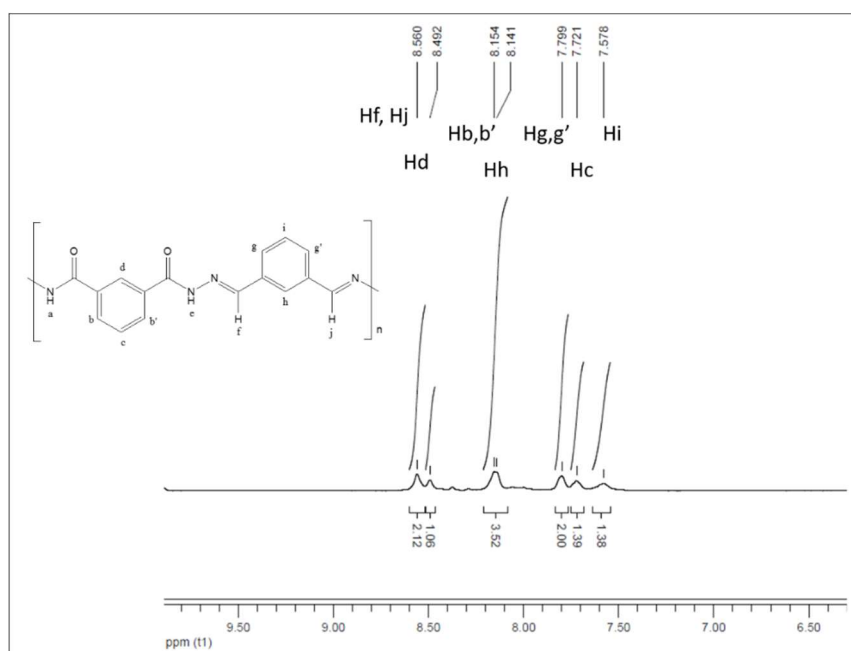


Figura 3.39. Expansão do espectro RMN ^1H para a poliacilhidrazona **5B** em DMSO-d_6 .

Para identificação dos carbonos da poliacilhidrazona **5B** foi necessário correlacionar os espectros obtidos pelas técnicas de ^{13}C , DEPT-135, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}/^1\text{H}$ HMBC. No espectro de ^{13}C é possível notar a presença de um sinal em δ 163,1 que foi atribuído aos carbonos das carbonilas C1 e C6, que também pode ser observado no espectro HMBC pela correlação entre Hd ou Hb com os carbonos C1 ou C6. Os carbonos C7 e C12 (vicinais ao anel aromático) foram atribuídos ao sinal em δ 148,0 os quais também foram comprovados pela correlação direta com

os hidrogênios Hf e Hj através do espectro HSQC e através da correlação entre C7 ou C12 com os hidrogênios Hg e Hg' no espectro HMBC. Seguindo a caracterização da poliacilhidrazona, os carbonos dos anéis aromáticos foram diferenciados: os carbonos C2 e C2' foram atribuídos ao sinal em δ 131,3 o qual apresentou a correlação direta entre Hb e Hb' no espectro HSQC e apresenta correlação entre C2, C2' e Hd no espectro HMBC. Os carbonos C8 e C8' foram atribuídos aos sinais em δ 135,3 e os carbonos C3 e C3' foram atribuídos ao sinal em δ 134,2. Ambos não aparecem no espectro de DEPT e HMQC uma vez que não há hidrogênio a ser correlacionado diretamente, entretanto apresentam correlações a longa distância como a correlação entre C3 e Hc; entre C8 e Hi ou C8 e Hf. O carbono C4 foi atribuído ao sinal presente em δ 127,4 o qual apresentou correlação direta no espectro HSQC com o hidrogênio respectivo Hd. O carbono C5 foi atribuído ao sinal em δ 129,9 o qual apresentou correlação direta no espectro HSQC com o hidrogênio respectivo Hc. O carbono C9 e C9' foi atribuído ao sinal em δ 129,3 o carbono C11 foi atribuído ao sinal em δ 125,3 e o sinal em δ 129,5 foi atribuído ao carbono C10 que apresentou correlação no HMBC com Hf, e dos quais foram observadas correlações diretas no espectro HSQC.

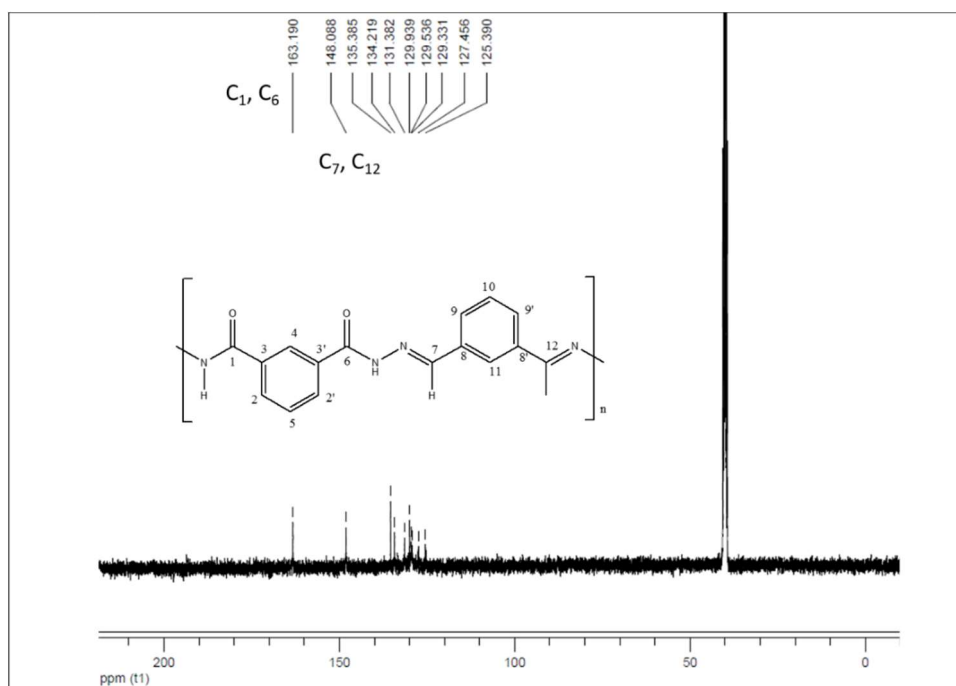


Figura 3.40. Espectro RMN ^{13}C para a poliacilhidrazona **5B** em DMSO-d_6 .

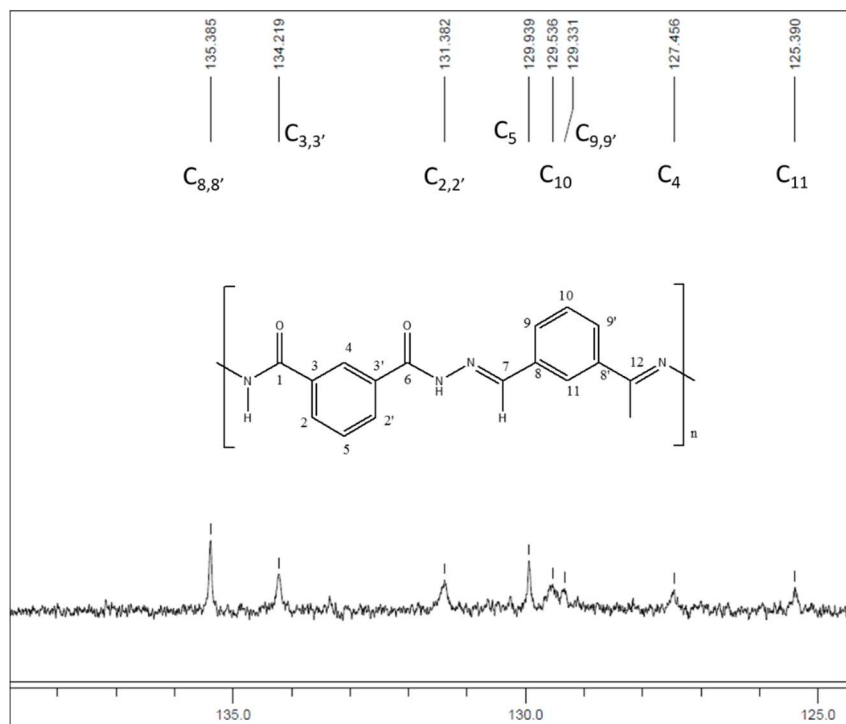


Figura 3.41. Expansão do espectro RMN ^{13}C para a poliacilhidrazona **5B** em DMSO-d_6 .

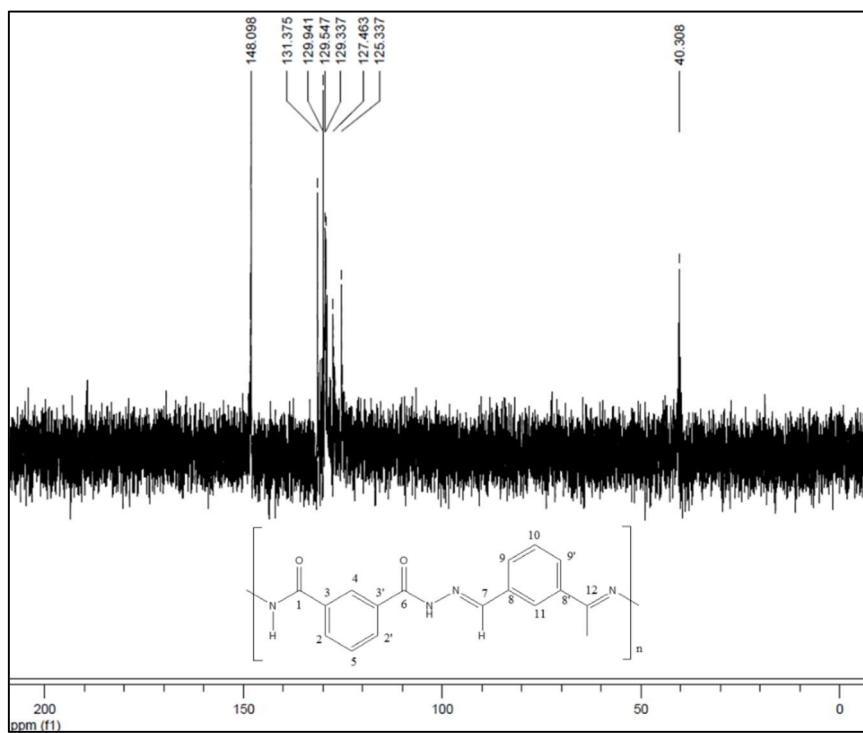


Figura 3.42. Espectro DEPT-135 para a poliacilhidrazona **5B** em DMSO-d_6 .

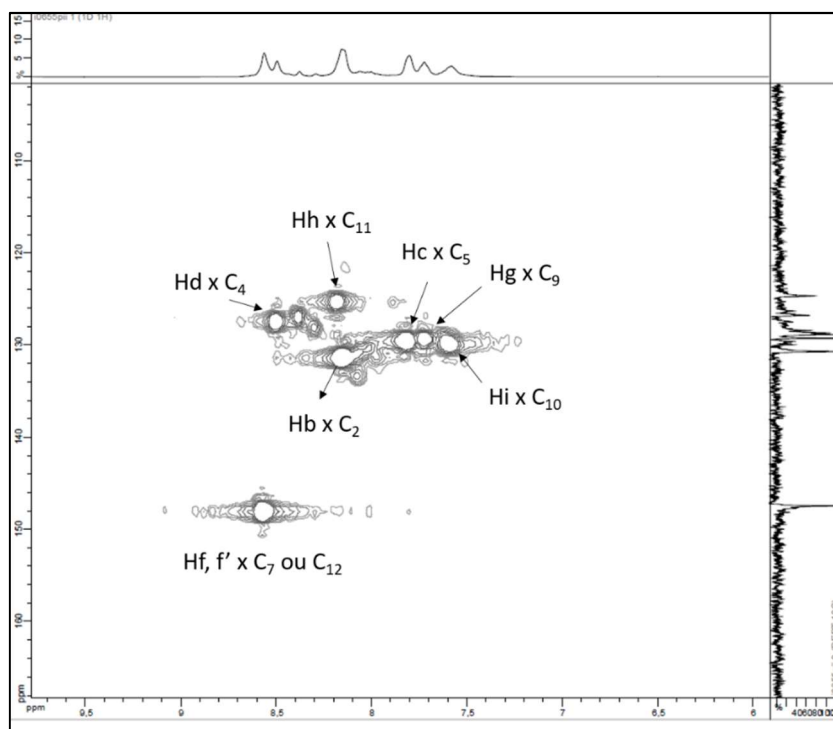


Figura 3.43. Espectro HSQC $^1\text{H}/\text{DEPT-135}$ para a poliacilhidrazona **5B** em DMSO-d_6 .

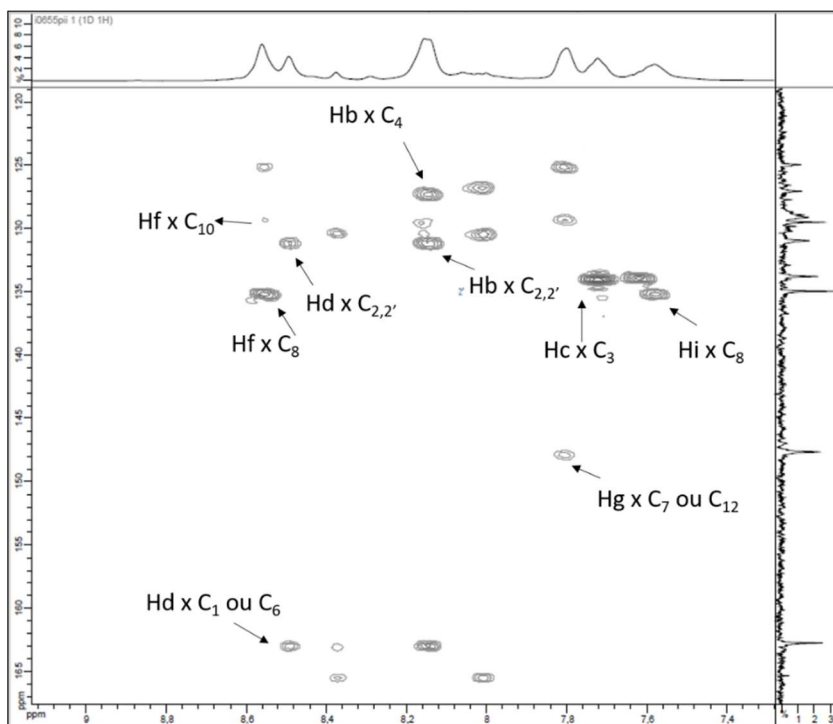


Figura 3.44. Espectro HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a poliacilhidrazona **5B** em DMSO-d_6 .

Após a obtenção e caracterização de **5A** e **5B**, para a conclusão da proposta de obtenção dos polímeros, o peso molecular dos mesmos poderia ser investigado utilizando técnicas como por exemplo cromatografia de permeação em gel (GPC) que poderia indicar a formação de polímeros ou oligômeros como indicado por ressonância. Porém após obtenção das mesmas

apenas 5B se mostrou parcialmente solúvel em DMSO, mas para ambos não foi possível encontrar um solvente em que fossem solúveis e que se pudesse comprovar a obtenção polimérica. Deste modo, planejou-se a formação de fibras poliméricas obtidas por eletrofiação com estas respectivas acilhidrazonas, visando-se estudar seu efeito de morfologia, resistência mecânica e permeabilidade para futuras aplicações em sistemas de liberação de fármacos, admitindo-se a formação do polímero. Como apenas a acilhidrazona **5B** se mostrou parcialmente solúvel em DMSO a formação de fibras poliméricas se restringiu apenas a este polímero e não do polímero puro, mas na formação de uma blenda deste com Polimetilmetacrilato, uma vez que a quantidade obtida para eletrofiação não se mostrou suficiente e com a adição da poliacilhidrazona a um polímero com baixa resistência mecânica na forma de fibras via eletrofiação seria possível observar a atuação desta como reforço na matriz de PMMA.

Apesar de não terem sido comprovados, os polímeros de acilhidrazonas durante sua síntese, revelaram um potencial amplo para este e futuros trabalhos. É observado na literatura que os intermediários hidrazidas 3a e 3b não foram estudados quanto a avaliação da atividade anti inflamatória (uma vez que existem relatos na literatura desta e outras atividades para esse grupo), objetivou-se o estudo *in vitro* da possível atividade anti-inflamatoria das hidrazidas pelo método de inibição proteica. A formação e caracterização da fibra de **5B** e PMMA será mostrada no final do Capítulo 4, bem como a utilização dos intermediários hidrazidas para avaliação de sua toxicidade e avaliação do perfil anti-inflamatoria.

CÁPITULO 4

**FORMAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS UNIAXIAIS
DE POLIMETILMETACRILATO E POLICAPROLACTONA
PARA LIBERAÇÃO DO FÁRMACO NIMESULIDA E FIBRAS
COM POLIACILHIDRAZONAS**

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO-FIBRAS UNIAXIAIS

4.1 FORMAÇÃO DAS FIBRAS UNIAXIAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO

As fibras formadas a partir de Polimetilmetacrilato (PMMA) e Policaprolactona (PCL), sem e com a presença do fármaco Nimesulida foram obtidas por eletrofiação seguindo os parâmetros descritos no Capítulo 2 Materiais e Métodos. A Tabela 4.1 apresenta os grupos de combinação dos materiais utilizados: Grupo 1- fibras sem presença do fármaco Nimesulida; Grupo 2- fibras com 30 mg do fármaco Nimesulida; Grupo 3- fibras com 60 mg do fármaco Nimesulida. A escolha do valor em massa para o fármaco Nimesulida é originada de um estudo prévio que visou a maior homogeneidade desta na fibra polimérica.

Tabela 4.1. Apresentação das fibras poliméricas formadas a partir de PMMA/PCL e Nimesulida.

Grupos	Fibra	PMMA (% m/v)	PCL (% m/m)	Nimesulida (mg)
Grupo 1	F1	12	---	---
	F2	---	35% m/v	---
	F3	12	6	---
	F4	12	12	---
	F5	1	21	---
Grupo 2	F6	12	6	30
	F7	12	12	30
	F8	12	21	30
Grupo 3	F9	12	6	60
	F10	12	12	60
	F11	12	21	60

O polímero PMMA, bem como o polímero PCL, são biocompatíveis e seguros para uso em sistemas de liberação controlada, (GAUTAM *et al.*, 2012) (BETTENCOURT, 2012). Como os dois polímeros são hidrofóbicos e não biodegradáveis, esses descritos na literatura amplamente para a formação de matrizes de liberação controlada em suportes ósseos, regeneração tecidual, sistemas adesivos ou sistemas transdérmicos (JEON; ELISSEEFF, 2016) (MONDAL; GRIFFITH; VENKATRAMAN, 2016) (CILURZO *et al.*, 2008) (FRANK *et al.*,

2011). Porém como as fibras poliméricas produzidas por eletrofiação a partir de PMMA apresentam propriedades mecânicas limitadas, como quebra sob impacto, (SAIN; RAY; MUKHOPADHYAY, 2015) (WU *et al.*, 2012) no presente trabalho não foram produzidas fibras para liberação controlada utilizando apenas o PMMA como matriz. Do mesmo modo, não foram produzidas fibras e ensaios de liberação apenas com PCL, apesar deste possuir propriedades mecânicas superiores ao PMMA, pois sua decomposição é muito mais lenta que a maioria dos polímeros utilizados em sistemas de liberação, como o PMMA, (MCNEIL; GRIFFITHS; PERRIE, 2011). Desse modo então, se fez necessário associar as propriedades dos dois polímeros para se obter um sistema de liberação com propriedades físicas e mecânicas desejáveis e após a obtenção das fibras as mesmas foram caracterizadas estruturalmente, mecanicamente e através de sua superfície para verificação de suas propriedades.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS UNIAXIAIS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO

4.2.1 Caracterização das fibras obtidas por eletrofiação por FTIR-ATR

Inicialmente as fibras foram caracterizadas por FTIR-ATR para verificar a presença das bandas características dos dois polímeros formadores das fibras, PMMA e PCL bem como a presença do fármaco Nimesulida, quando adicionado. As principais bandas referentes aos polímeros e ao fármaco que constituem a fibra estão apresentadas nos espectros de FTIR-ATR na Figura 4.1. Não foram observadas diferenças significativas entre as fibras apesar do aumento da concentração de PCL nem mesmo do fármaco e por isso apenas um espectro de cada grupo foi aqui utilizado para discussão. Este fato pode estar associado a semelhança na constituição química dos dois polímeros (apresentando modos vibracionais muito semelhantes) e a baixa concentração do fármaco, que por sua vez pode estar disperso no interior da fibra e não ser muito identificado pelo método de refletância atenuada (BUFFETEAU; DESBAT; EYQUEM, 1995).

A análise do espectro FTIR-ATR para a fibra de PMMA F1 (Figura 4.1a) permite observar as bandas típicas do polímero, como o ν C-H para os grupamentos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$, em 2991 a 2951 cm^{-1} ; a banda de ν C=O para o grupamento éster em 1722 cm^{-1} bem como a banda de ν C-O de ésteres em 1141 cm^{-1} . Essa banda dupla típica, é originária do acoplamento de duas bandas assimétricas típicas: o ν C-C(=O)-O e o ν O-C-C, sendo a primeira a mais

importante e a mais intensa (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). A banda em 1434 cm^{-1} foi atribuída a estiramento simétrico dos grupamentos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$.

O espectro da Figura 4.1b mostra as bandas referentes à fibra F2 (PCL). As bandas de 2946 a 2866 cm^{-1} são relativas ao ν C-H para grupamentos $-\text{CH}_2$; a banda em 1722 cm^{-1} relativa ao ν C=O de ésteres e as bandas em $1238, 1164$ e 1048 cm^{-1} foram atribuídas ao ν C-O de ésteres, típicos de cadeias longas. A banda em 1471 cm^{-1} foi atribuída ao σ_s (no plano) para o grupamento $-\text{CH}$ e a banda em 1365 cm^{-1} mostra ao σ_{ass} (fora do plano) para o grupamento $-\text{CH}_2$.

O espectro para o fármaco Nimesulida (Figura 4.1c) condiz com a literatura, apresentando bandas típicas do mesmo dentre as quais podemos destacar, a banda referente ao ν N-H em 3279 cm^{-1} seguido das bandas de ν C-H do anel aromático em 3090 cm^{-1} . Também puderam ser atribuídas as bandas referentes a σ_{ass} do grupo $-\text{NO}_2$ em 1589 cm^{-1} ; a banda em 1516 cm^{-1} referente a σ do grupo $-\text{NH}$ da sulfonamida; em 1488 cm^{-1} o ν C=C do anel aromático; a banda em 1316 cm^{-1} atribuída à σ_{ass} de S=O; o ν C-O em 1150 cm^{-1} e a σ de $-\text{CH}$ dos anéis aromáticos em 1080 cm^{-1} .

Entre as blendas poliméricas formadas, foram utilizadas como exemplo para a discussão F4, F7 e F10 (Figura 4.1d, e, f, respectivamente). Entre as mesmas não foram observadas diferenças significativas a não ser na presença da banda de ν N-H da sulfonamida para as fibras que contém o fármaco Nimesulida (nas fibras F7 e F10). Porém, para todas as fibras foi possível observar como bandas principais o ν da ligação C-H em aproximadamente 2948 cm^{-1} ; o ν da ligação C-O em 1724 cm^{-1} ; a σ_s (no plano) de $-\text{CH}_2$ em aproximadamente 1435 cm^{-1} e o ν C-O de ésteres em aproximadamente 1240 e 1146 cm^{-1} .

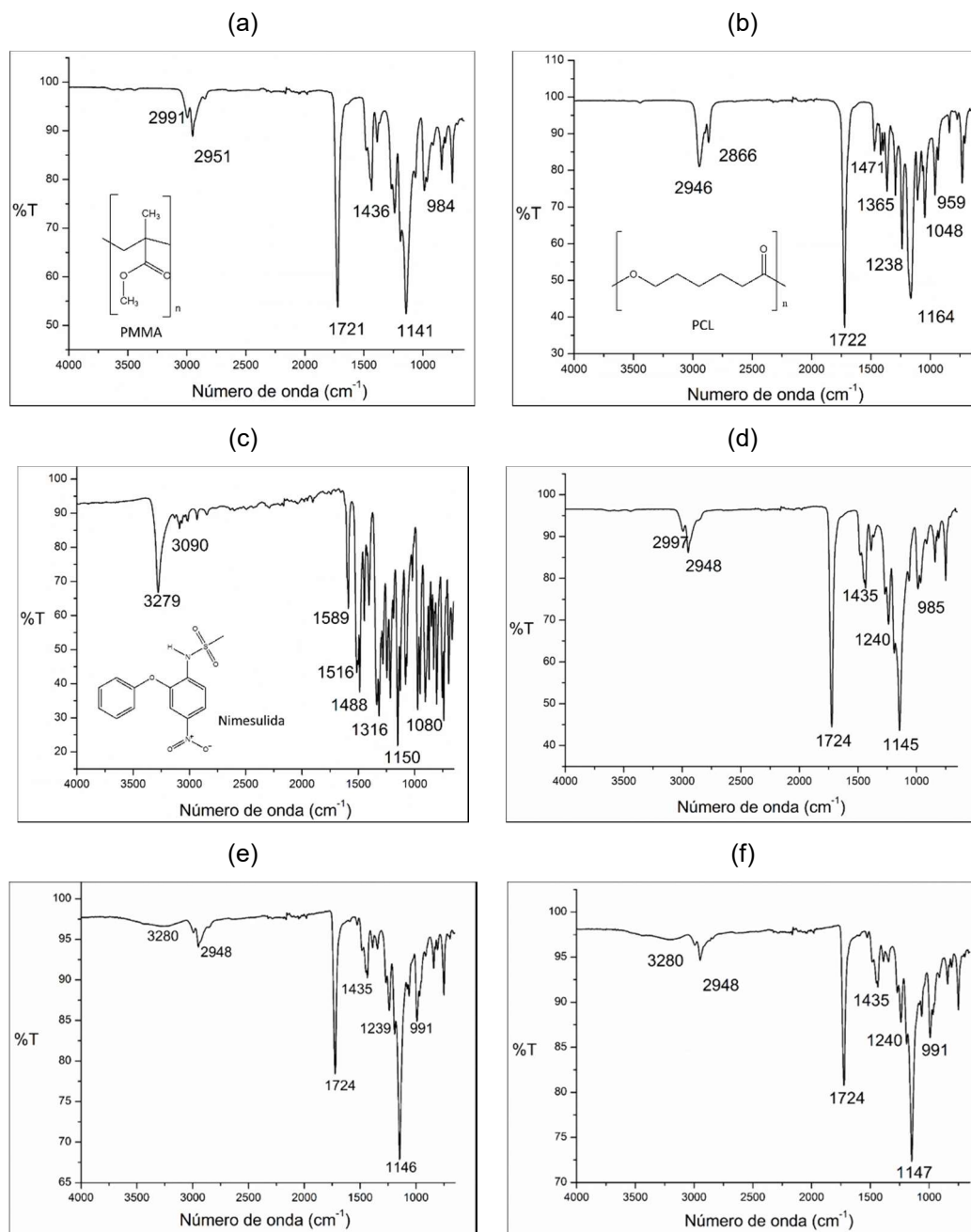


Figura 4.1. Espectros FTIR-ATR na região ampliada de 4000 a 900 cm^{-1} ; (a) Fibra de PMMA 12 % m/v; (b) Fibra de PCL 35 % m/v; (c) Nimesulida; (d) Blenda polimérica de PMMA 12 %m/v e PCL12 % m/m; (e) Blenda polimérica de PMMA 12 % m/v e PCL 12 % m/m com 30 mg de Nimesulida; (f) Blenda polimérica de PMMA 12 % m/v e PCL 12 % m/m com 60 mg de Nimesulida.

4.2.2 Caracterização térmica das fibras: TG e DSC

Seguindo a caracterização dos sistemas poliméricos obtidos por eletrofiação foram realizadas as análises de termogravimetria (TG) e sua derivada termogravimetria derivada (dTG) para as fibras. A Figura 4.2 mostra o termograma para a fibra F1, bem como a derivada do termograma (dTG).

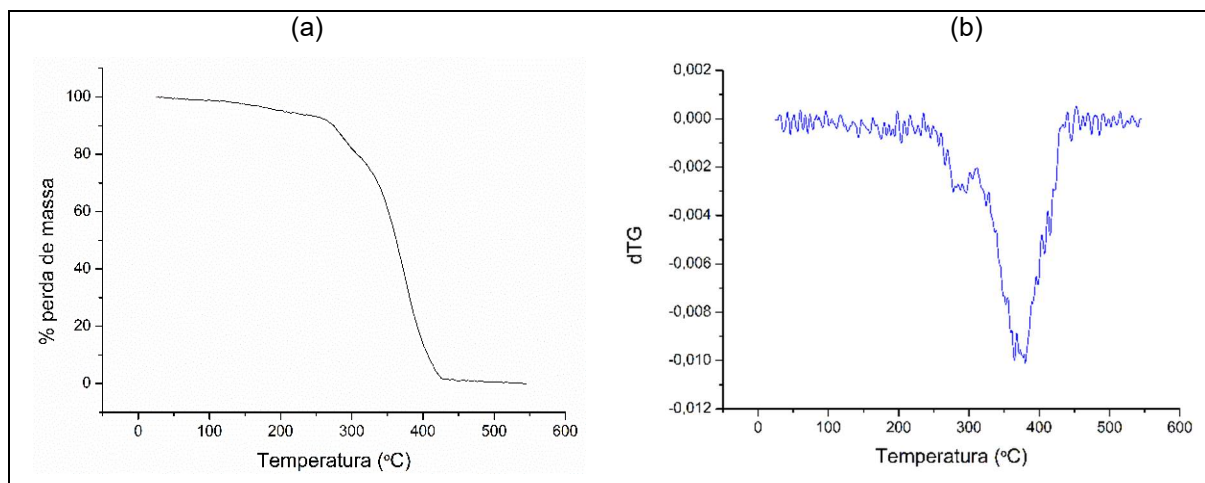


Figura 4.2. Análise Térmica para PMMA: a) curva TG para PMMA na faixa de 37-600°C b) curva dTG para PMMA.

Podem ser observados de acordo com a literatura (WUNDERLICH, 1997) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001) dois eventos típicos para a degradação do polimetilmetacrilato: um primeiro evento em temperaturas próximas a 265-296 °C e um segundo evento em temperaturas próximas a 325-379 °C conforme observado na curva TG (Figura 4.2 a). Também com base nessa curva foi possível encontrar a temperatura para início da decomposição, T_{onset} para F1 em 262 °C e a temperatura T_{endset} (temperatura mínima para o último evento associado a decomposição) que se apresentou em 426 °C. Na análise da curva dTG (Figura 4.2 b) pode-se encontrar a temperatura de máximo de conversão $(dc/dt)_{máx}$ como grupos de valores distintos associados a dois eventos posteriormente descritos: um primeiro evento em 265-296 °C e um segundo entre 325-379 °C.

O processo de decomposição do polimetilmetacrilato ocorre em duas etapas sendo a despolimerização com formação do seu respectivo monômero e a formação de macrorradicais livres que em altas temperaturas formam produtos volatilizáveis. A primeira etapa (em menor temperatura) ocorre com a reação de despolimerização iniciada nos grupos terminais do monômero a partir da quebra aleatória de uma ligação C-C, gerando radicais. Já a segunda é o resultado da descompactação das cadeias poliméricas por clivagem dos monômeros radicalares gerando novos radicais que são rapidamente degradados (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001) (DE PAOLI, 2009) conforme o mecanismo mostrado na Figura 4.3. Os dados de TG e dTG corroboraram com os dados da literatura, caracterizando assim termicamente a fibra F1.

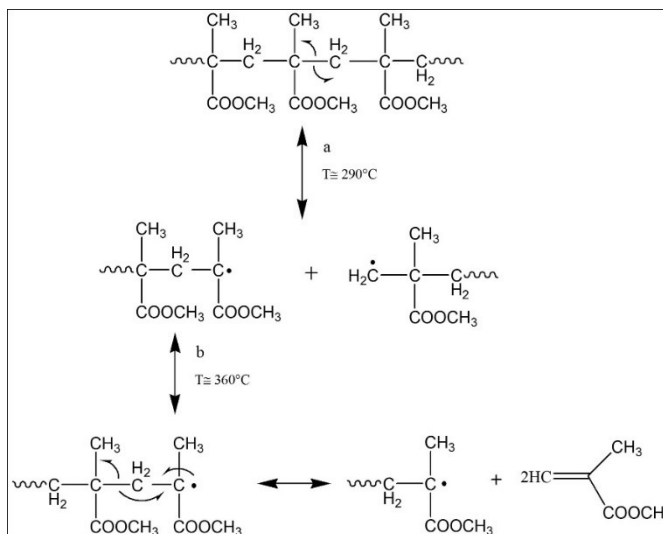


Figura 4.3. Proposta do mecanismo de degradação térmica de PMMA (DE PAOLI, 2009).

A análise do termograma (TG), da sua derivada (dTG) para a fibra de PCL (F2), permite observar de acordo com a literatura (HAKKARAINEN; ALBERTSSON; KARISSON, 1996) (FINOTTI, 2014) o evento típico para a degradação de poliésteres como a policaprolactona com uma temperatura $(dc/dt)_{\text{máx}}$ de 410°C . Com base na curva TG (Figura 4.4 a) foi possível encontrar a temperatura para início da decomposição T_{onset} para a fibra de PCL em 365°C e a temperatura T_{endset} em 426°C , corroborando com os dados da literatura (FOSTER *et al.*, 2015).

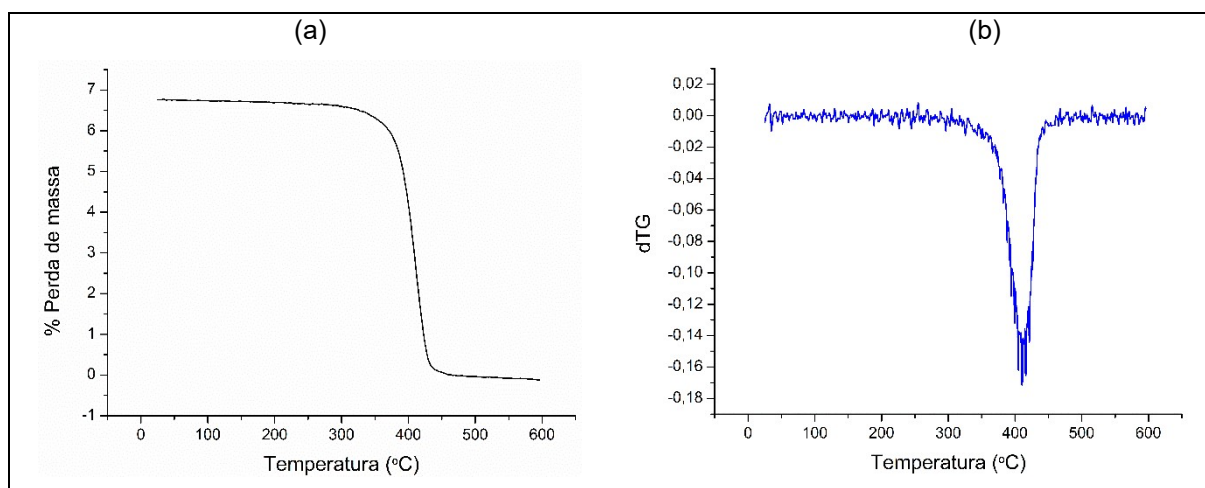


Figura 4.4. Análise Térmica para a fibra de PCL; a) curva TG para PCL na faixa de $37\text{-}600^\circ\text{C}$; b) curva dTG para PCL.

A decomposição da policaprolactona, assim como para os demais poliésteres, ocorre inicialmente com a hidrólise dos grupamentos ésteres (degradação hidrolítica) nas regiões mais amorfas do polímero. Após essa degradação, pode haver perda de cristalinidade oriunda da despolimerização do PCL em seus monômeros que leva a uma diminuição da massa do

polímero (FINOTTI, 2014). Os dados de TG e dTG experimentais são condizentes com os dados da literatura, caracterizando assim termicamente a fibra F2.

Do mesmo modo, a análise termogravimétrica para o fármaco Nimesulida, Figura 4.5, condiz com os dados já reportados na literatura (SKIBA *et al.*, 2014) (GÁLICO *et al.*, 2014) (SANPHUI; SARMA; NANGIA, 2010), apresentando na dTG um pico referente a temperatura $(dc/dt)_{\text{máx}}$ de 322 °C. A análise do curva TG em temperatura de até 600 °C para Nimesulida permitiu definir os valores de T_{onset} como 250 °C e a temperatura T_{endset} em 352 °C. Observa-se que ao final da TG ainda existe um percentual de massa residual de aproximadamente 36 % para Nimesulida, o que é condizente com a literatura que apresentou dados de até 65 % de decomposição para a mesma faixa de temperatura (GÁLICO *et al.*, 2014). A decomposição do fármaco Nimesulida dá em duas etapas: a primeira em temperaturas iniciais próximas a 250 °C como a própria decomposição do composto, e a segunda em temperaturas entre 405-755 °C como a etapa de carbonização dos compostos residuais formados (GÁLICO *et al.*, 2014) (SKIBA *et al.*, 2014). Deste modo, os dados apresentados na literatura são condizentes com o observado na literatura para a caracterização térmica da Nimesulida.

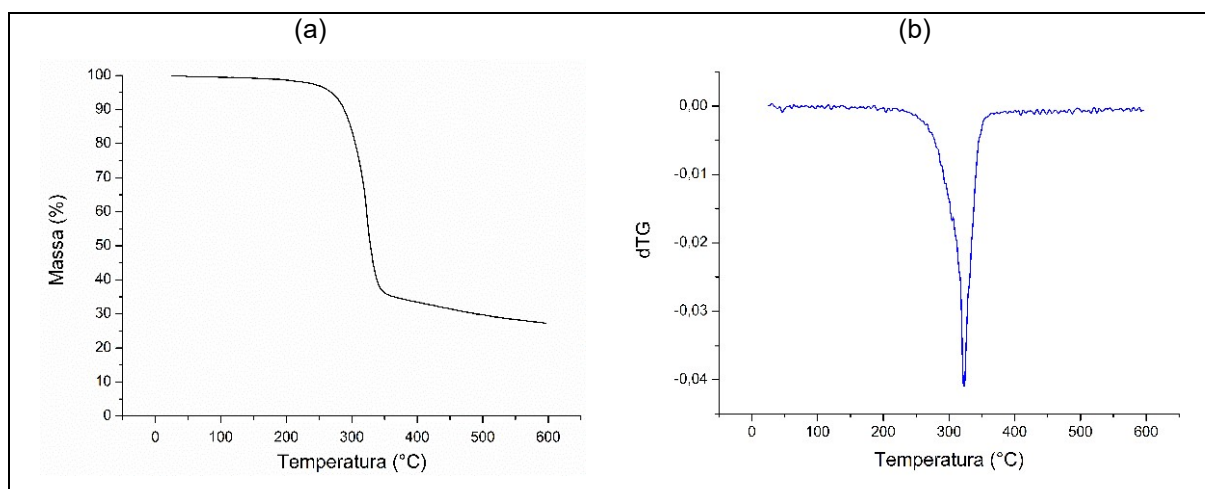


Figura 4.5. Análise Térmica para Nimesulida: a) curva TG para Nimesulida na faixa de 37-600°C; b) curva dTG para Nimesulida.

As análises dos termogramas das blendas poliméricas sem o fármaco Nimesulida F3, F4 e F5 (nas proporções de 6, 12 e 21 % m/m de adição de PCL à matriz de PMMA respectivamente) não mostrou diferenças significativas quando comparadas ao polímero em maior proporção constituinte das blendas (PMMA F1). Porém, quando analisamos a DTG para essas fibras notamos que quanto maior o aumento da proporção de PCL maior o deslocamento do sinal referente ao segundo evento térmico da degradação de PMMA para valores de temperatura próximos a 400 °C, Figura 4.6 a, b e c. Este fato demonstra a presença de PCL em proporções crescentes nas fibras F3, F4 e F5 uma vez que o sinal de decomposição do PCL e o

sinal referente ao evento de cisão dos radicais formados na decomposição de PMMA estão quase sobrepostos (temperaturas de 410 e 379 °C).

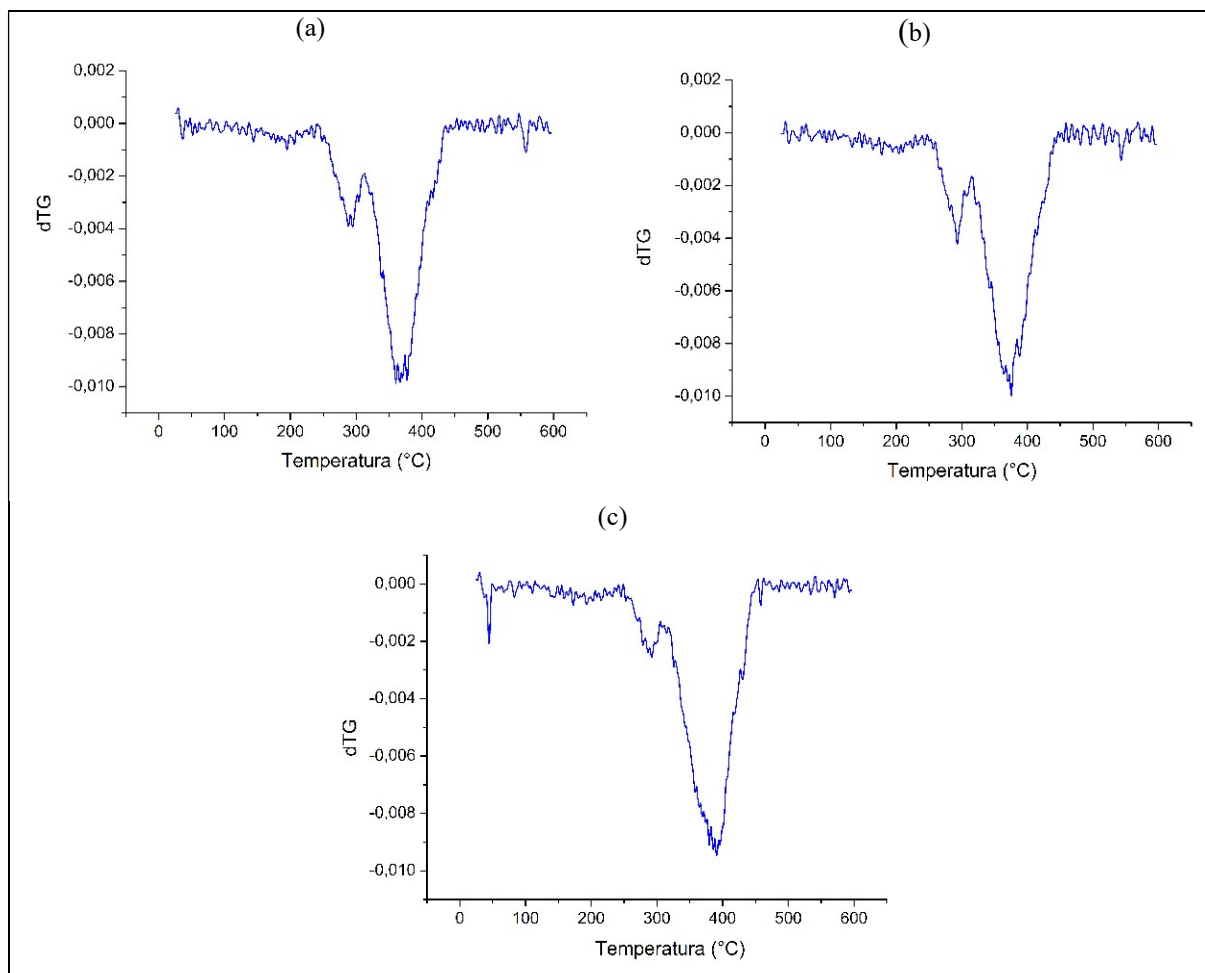


Figura 4.6. Análise térmica curvas dTG para as blendas de PMMA e PCL sem fármaco Nimesulida na faixa de 37-600°C: a) curva dTG para a blenda F3; b) curva dTG para a blenda F4; c) curva dTG para a blenda F5.

As blendas contendo o fármaco Nimesulida em 30 mg (Fibras F6, F7, F8) e de 60 mg (Fibras F9, F10, F11) apresentaram dTG's muito semelhantes entre si, mas diferentes das fibras sem o fármaco, Figura 4.7. Como a temperatura $(dc/dt)_{\text{máx}}$ para a Nimesulida (em 322 °C) é muito próxima ao primeiro evento observado na dTG para o PMMA (próximo a 325°C) não é possível se observar sinais separados referentes ao fármaco. Entretanto, ocorre o aumento expressivo deste evento em $(dc/dt)_{\text{máx}}$ próximo a 300 °C que pode ser associado à presença de Nimesulida nas fibras. Novamente, o deslocamento do sinal associada ao segundo evento para PMMA e para a degradação de PCL para o valor de temperatura próximo a 400 °C também pode caracterizar as blendas poliméricas.

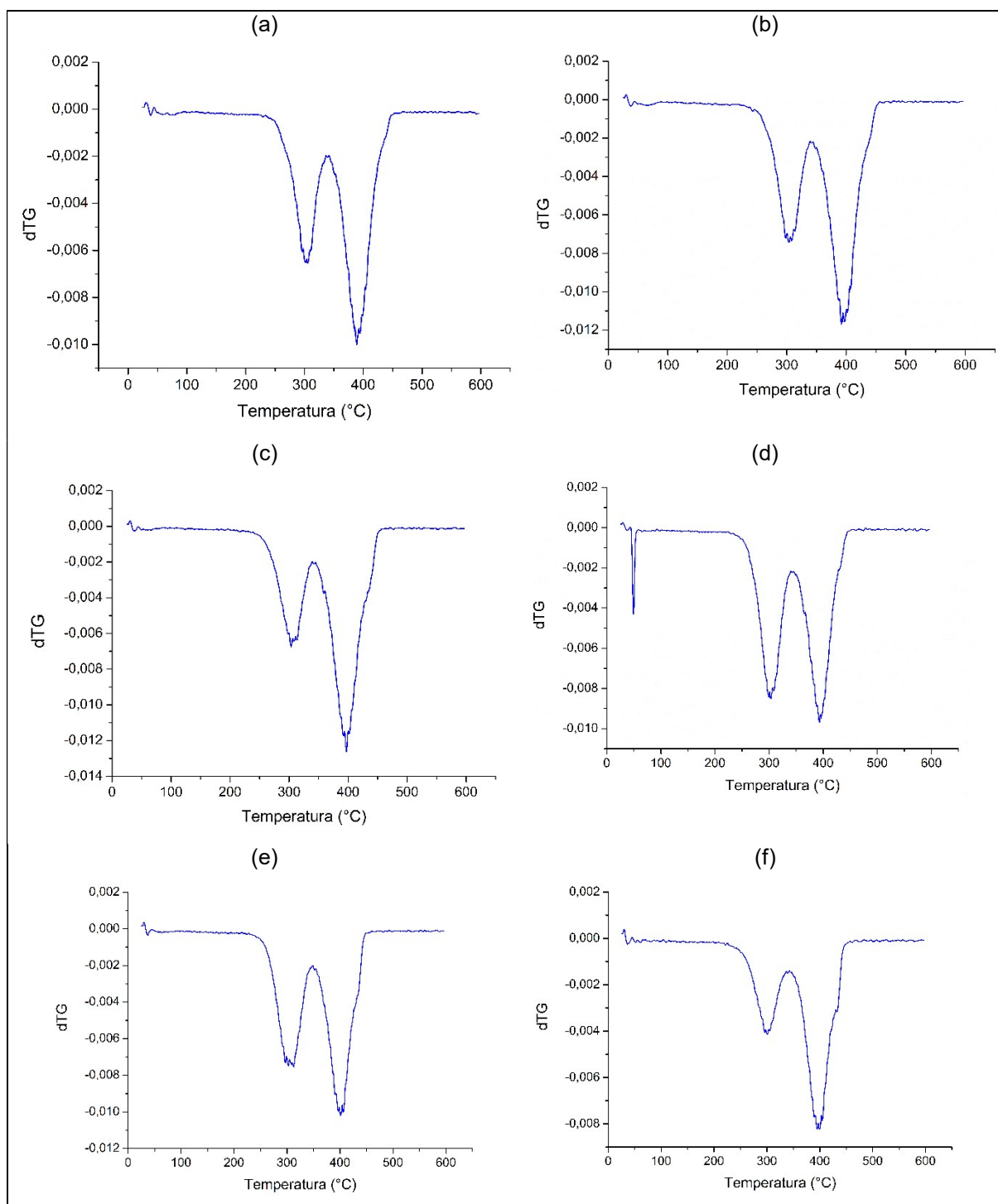


Figura 4.7. Análise térmica: curvas dTG para as blends de PMMA e PCL com fármaco Nimesulida na faixa de 37-600°C: a) curva dTG para a blenda F6, (b) curva dTG para a blenda F7, (c) curva dTG para a blenda F8, (d) curva dTG para a blenda F9, (e) curva dTG para a blenda F10, (f) curva dTG para a blenda F11.

Também para a caracterização das fibras foi realizada a calorimetria diferencial de exploratória (DSC) com o objetivo de se analisar a quantidade de calor absorvido ou liberado durante o aquecimento em função do tempo, analisando se o processo ocorrido no aquecimento das fibras é endotérmico ou exotérmico. Também foram analisados os eventos/transições decorrentes do aquecimento, como a T_g (temperatura de transição vítrea), a T_m (temperatura de

fusão) ou T_c (temperatura de cristalização), conforme observado na literatura (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001) (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

De acordo com a literatura, o valor de T_g para o polimetilmetacrilato é encontrado na faixa de 105-120 °C e o valor de T_m é de aproximadamente 160 °C, não sendo muitas vezes observado o pico de T_m por este ser sobreposto em uma série de eventos térmicos anteriores à temperatura de 200 °C (BONFIM, 2009) (MANO; MENDES, 1999) (MARK, 2007). Para a policaprolactona, os valores de T_g e T_m na literatura são respectivamente de aproximadamente -60 °C e entre 59-64 °C (SINHA *et al.*, 2004).

Pode ser observado nos termogramas da Figura 4.8 que os valores encontrados para T_g e T_m dos polímeros e das blendas foram bem próximos aos relatados na literatura. A baixa qualidade dos termogramas pode ser associada à pouca quantidade de amostra utilizada ou até mesmo a faixa de temperatura baixa (até 200 °C). Foi possível apenas se obter o valor de T_g para o PMMA e T_m para PCL, porém esses valores nas blendas poliméricas estão bem próximos dos valores relatados na literatura.

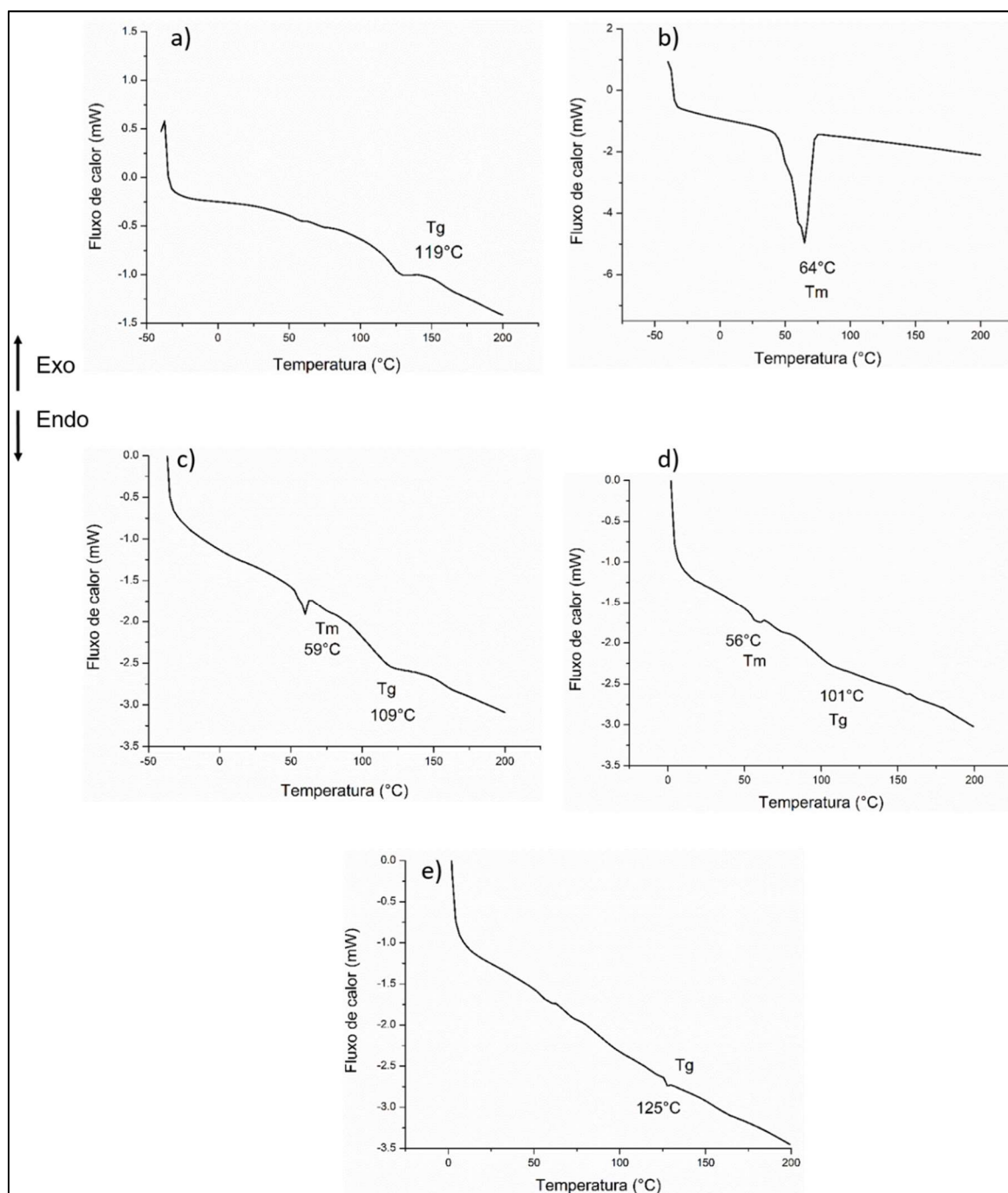


Figura 4.8. Curvas DSC para as fibras e blends de PMMA e PCL: a) para a fibra de PMMA, b) para a fibra PCL, c) para a blenda F3 (6 % PCL), d) para a blenda F4 (12 % PCL), e) para a blenda F5 (21 % PCL).

Como a policaprolactona apresenta um pico endotérmico referente a fusão (transição de primeira ordem) muito intenso e bem definido oriundo de sua semi-cristalinidade muitas vezes para blends na presença de PCL é comum se observar três diferentes tipos de comportamento: a) blends com um único pico endotérmico e propriedades mecânicas compatíveis; b) valores de T_g de cada polímero formador da blenda e valores de propriedades mecânicas superiores ou c) blends incompatíveis com exibição de aumento das propriedades de fases separadas

(SINHA *et al.*, 2004). No caso das blendas aqui produzidas podemos observar o sinal referente a fusão de PCL mais pronunciado em todas as fibras com exceção da fibra F5 (21 % de PCL) podendo demonstrar a estabilização e homogeneidade da fibra (NAIR *et al.*, 2001) e, como veremos adiante, a presença de PCL atuou como reforço para melhora das propriedades mecânicas das blendas. Ainda podemos observar que o valor de Tg em todas as blendas por se encontrar próximo ao valor encontrado na literatura e não deslocado para valores superiores, demonstra a não existência de fortes interações, como ligações de hidrogênio, entre os grupos terminais dos polímeros. Isso é observado pela estrutura dos polímeros que podem apresentar interações hidrofóbicas em maior extensão. Este fato por sua vez é diferentemente observado em blendas de PMMA e celulose (DONG *et al.*, 2012) que apresentam fortes interações do tipo ligação de hidrogênio e aumentam o valor Tg devido à restrição conformacional dos segmentos poliméricos, sendo este deslocamento de Tg fundamental em sua caracterização.

Para as fibras contendo o fármaco Nimesulida (F6-F11), é possível observar que as transições encontradas não se diferenciam muito das encontrados na literatura para os polímeros e fármaco isolados, como apresentado na Figura 4.9.

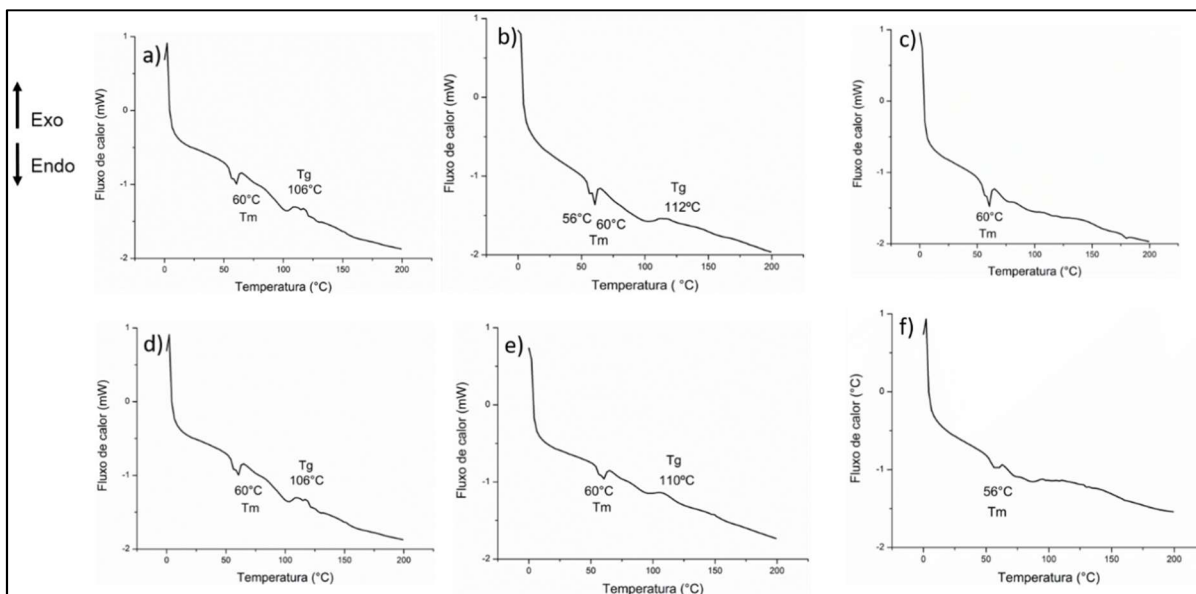


Figura 4.9. Curvas DSC para as blendas de 12 % PMMA m/v e quantidades crescentes de PCL na presença do fármaco Nimesulida, a) para a blenda F6, b) para a blenda F7, c) para a blenda F8, d) para a blenda F9, e) para a blenda F10, f) para a blenda F11.

4.2.3 Caracterização de superfície: microscopia eletrônica de varredura e ângulo de contato

Seguindo a caracterização das blendas poliméricas obtidas por eletrofição foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as fibras. A Figura 4.10 mostra as imagens obtidas para as fibras com magnitude de 2.000 X. Pode-se observar que as fibras apresentam uniformidade em toda a extensão de sua superfície, fato que pode ser atribuído, segundo a literatura (SILL; VON RECUM, 2008) (GREINER; WENDORFF, 2007), aos parâmetros do sistema de eletrofição como a distância entre o bico injetor e a placa coletora, o fluxo de injeção da solução polimérica e a voltagem utilizada no sistema.

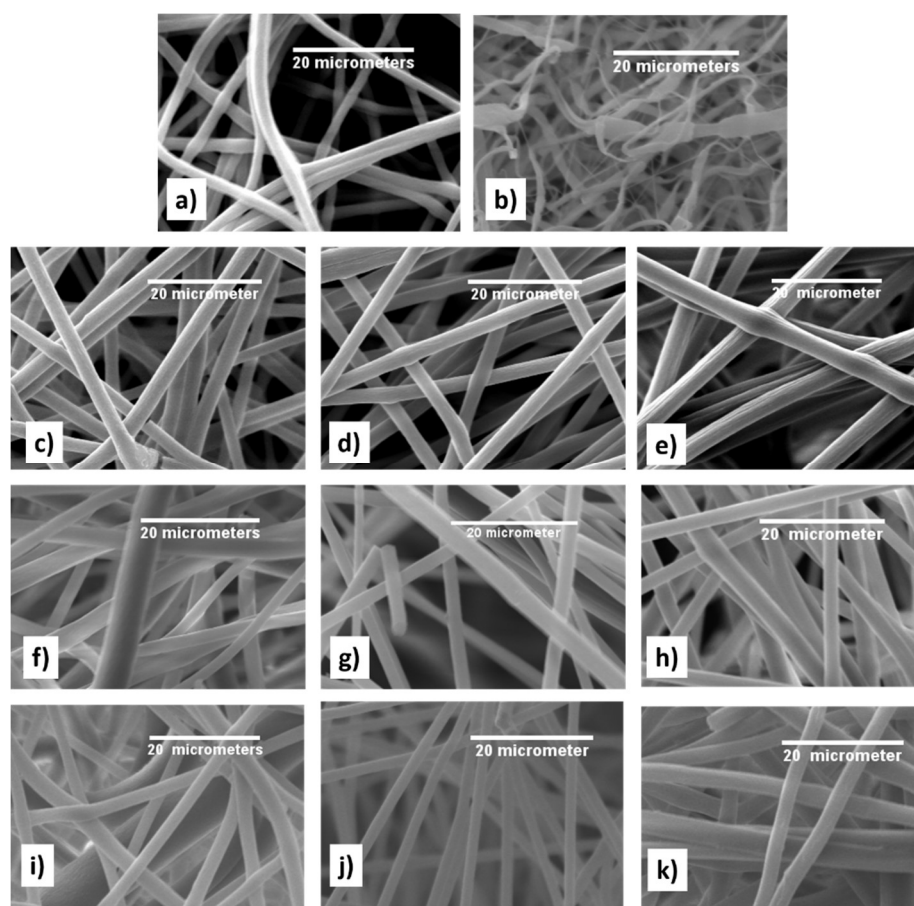


Figura 4.10 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofição: a) F1-PMMA, b) F2-PCL, c) F3, d) F4, e) F5, f) F6, g) F7, h) F8, i) F9, j) F10, k) F11 – todas com aproximação de 2.000X.

Ainda analisando as imagens obtidas por MEV notou-se a ausência de gotas, fusos ou poros na superfície das fibras. Este fato pode ser associado (além da estabilidade dos parâmetros da eletrofição) à utilização do solvente DMF, pouco volátil, em maior proporção na obtenção das fibras. Há relatos na literatura da influência do solvente não só na obtenção das fibras

poliméricas, mas também na formação de porosidade das fibras sendo este processo causado por um efeito dinâmico da separação das fases polímero-solvente como consequência da taxa de evaporação do mesmo. Quando solventes muito voláteis, como THF, levam a evaporação do solvente em altas taxas durante a eletrofiação a solução que está sendo injetada torna-se instável podendo haver separação das fases: a fase rica em polímero se solidifica assim que ocorre a evaporação e essa evaporação leva a formação de poros nessas fibras (COSTA *et al.*, 2012) (GREINER; WENDORFF, 2007). Observa-se ainda pelo tamanho médio das fibras (diâmetro médio a partir de 60 medidas) que as mesmas são da ordem de 2,3 μm conforme observado na Tabela 4.2 e são significativamente diferentes em relação ao seu diâmetro médio. Na análise estatística para o pós teste de Tuckey, as letras sobrescritas indicam diferentes grupos de análise. As mesmas propriedades foram observadas tanto para as fibras com ou sem Nimesulida, sendo possível notar que a presença do fármaco não altera significativamente a morfologia das fibras, mas o incremento do fármaco aumenta significativamente o diâmetro das blendas e relação às mesmas sem o fármaco.

Tabela 4.2. Apresentação do diâmetro médio para as fibras poliméricas obtidas por eletrofiação a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura em magnitude de 2000X.

Fibra	Diâmetro médio- 60 medidas (μm)
F1	$1,7 \pm 0,1^a$
F2	$1,5 \pm 0,2^b$
F3	$2,6 \pm 0,2^c$
F4	$2,4 \pm 0,2^d$
F5	$3,4 \pm 0,1^e$
F6	$2,7 \pm 0,3^c$
F7	$2,1 \pm 0,1^f$
F8	$2,2 \pm 0,1^f$
F9	$2,1 \pm 0,1^{f,g}$
F10	$2,2 \pm 0,2^{f,h}$
F11	$2,5 \pm 0,1^i$
Média entre as fibras	$2,3 \pm 0,4$

A técnica de medida do ângulo de contato da água com a superfície das microfibras foi aplicada com o objetivo de se conhecer as características de hidrofília e hidrofobia da superfície

das blendas obtidas com e sem fármaco. A Figura 4.11 é um representativo da imagem obtida pela técnica de ângulo de contato mostrando a gotícula de água sob a superfície das blendas poliméricas obtidas. Nesta imagem podemos perceber que a gota de água não é adsorvida pela superfície das fibras demonstrando a características hidrofóbica das mesmas. A partir dos valores para os ângulos de todas as fibras presentes na Tabela 4.3 pode-se notar que todas as fibras apresentam características hidrofóbicas, sendo que para o grupo 1 (fibras F3, F4, F5 sem o fármaco Nimesulida) a fibra com F4 apresenta menor valor de ângulo em comparação as demais. Para os grupos 2 e 3, com adição de 30 e 60 mg de Nimesulida respectivamente, os valores se tornam iguais ou menores quando comparado ao valor para a fibra de PMMA puro, demonstrando que a presença do fármaco Nimesulida (apesar de também ser uma molécula hidrofóbica) interfere pouco na hidrofobicidade superficial das fibras tornando-as um pouco menos hidrofóbicas.

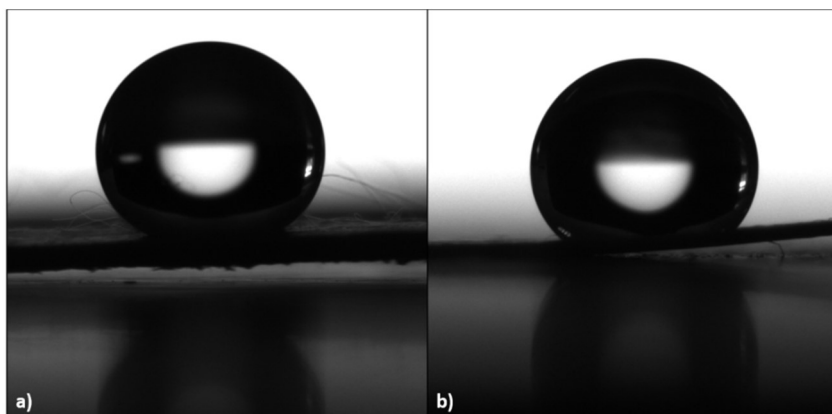


Figura 4.11. Imagens de gotas de água em microfibras: a). PMMA 12 % m/v e PCL 6 % m/m b) PMMA12 % m/v e PCL 6 % m/m com 30 mg de Nimesulida.

Tabela 4.3. Valores dos ângulos de contato entre as fibras obtidas e as gotículas de água (média de 10 valores).

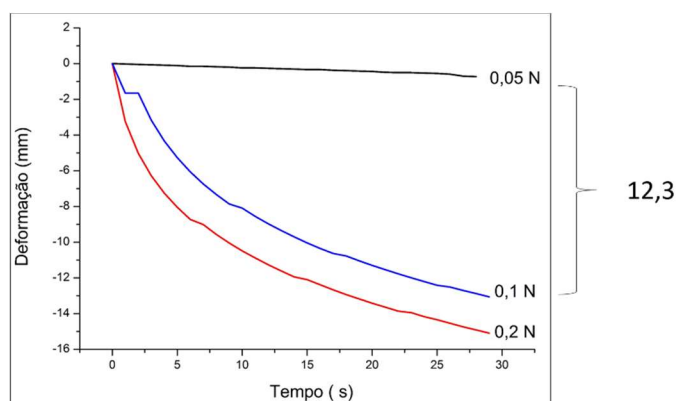
Fibra	Valor de ângulo de contato com água ($\bar{x}$) e desvio padrão de 10 medidas
F1	147±2 ^a
F2	152±6 ^a
F3	145±9 ^a
F4	139±5 ^a
F5	147±6 ^a
F6	147±9 ^{a,b}
F7	139±8 ^{a,b}
F8	144±6 ^{a,b}
F9	137±9 ^{a,b}

F10	136±9 ^{a,b}
F11	126±3 ^{a,b,c}

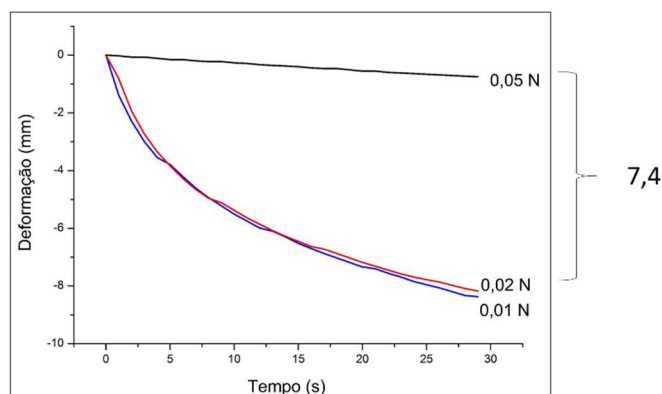
4.2.4 Caracterização mecânica das fibras: análise termomecânica –TMA

A análise termomecânica (TMA) foi realizada com o objetivo de se comparar as propriedades mecânicas através de gráficos do perfil de deformação *versus* tempo para as blendas poliméricas obtidas com e sem a presença do fármaco Nimesulida.

A Figura 4.12 mostra o perfil dos gráficos obtidos para a comparação dos ensaios de TMA para as fibras de PMMA e PCL puros. Os ensaios foram realizados com aplicação de um sistema de forças de 0,05; 0,1 e 0,2 N, à temperatura fixa de 37 °C em intervalos de 30 segundos, em fibras com mesma espessura de 0,383 mm. A partir do gráfico é possível observar que para a fibra de PMMA (Figura 4.11b) a variação da deformação ocorrida entre as forças aplicadas de 0,05 e 0,1 é bem maior que a ocorrida para PCL (7,4 para PCL e 12,3 para PMMA).



a)



b)

Figura 4.12. Gráficos deformação *versus* tempo obtidos pela análise de TMA; a). Fibra de PMMA e b). Fibra de PCL.

Como visto nos gráficos deformação *versus* tempo para essas fibras, o valor da diferença de deformação entre as tensões aplicadas para o PMMA é muito maior que o valor aplicado à fibra de PCL demonstrando que a fibra de PMMA apresenta menor resistência a deformação do que a fibra de PCL, uma vez que não apresenta grande elasticidade na volta ao perfil original da fibra após a primeira deformação sem se quebrar, ou seja, pode ser considerada menos resistente. Já a fibra de PCL apresenta uma menor deformação entre a primeira e segunda aplicação de forças, o que pode sugerir uma maior elasticidade da fibra que pode voltar à seu estado original sem se deformar tanto em relação ao mesmo tempo de observação para PMMA.

Diante do resultado obtido para as fibras de PMMA e PCL puras o mesmo ensaio termomecânico foi realizado para as blendas poliméricas de PMMA/PCL com e sem o fármaco. A Figura 4.13 apresenta os gráficos deformação *versus* tempo para as blendas PMMA/PCL sem fármaco Nimesulida; Figura 4.14 para as blendas com 30 mg do fármaco e a Figura 4.15 para as blendas com 60 mg do fármaco respectivamente.

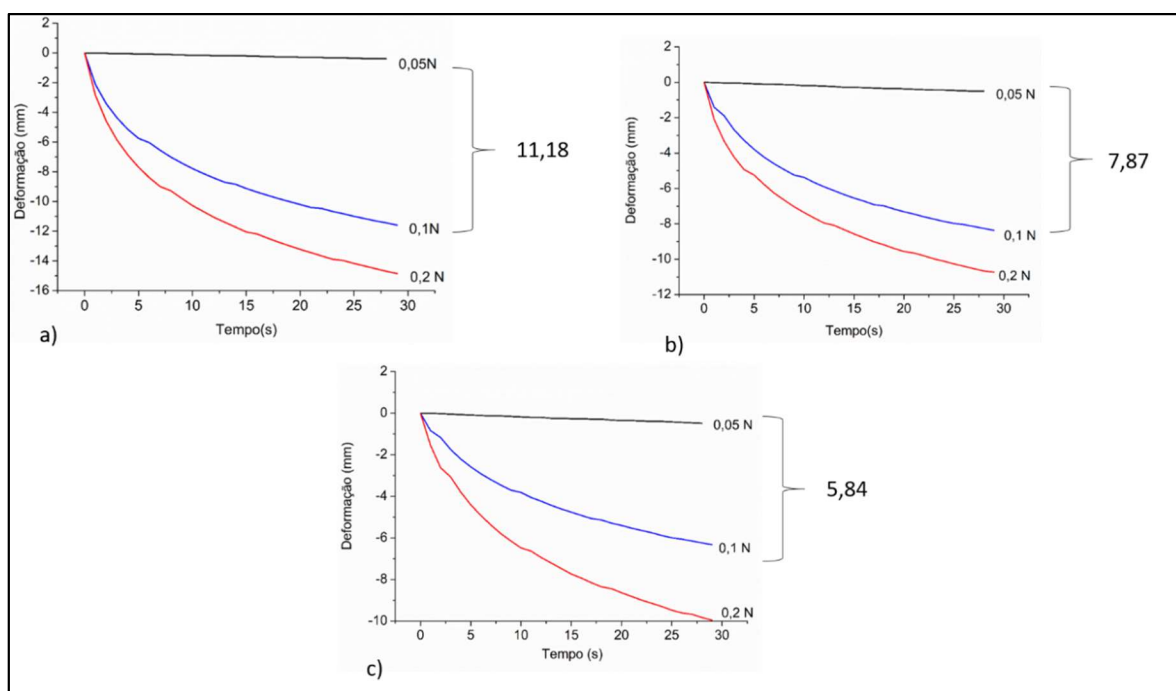


Figura 4.13. Gráficos deformação *versus* tempo obtidos pela análise de TMA; a) fibra F3; b) fibra F4 e c) fibra F5.

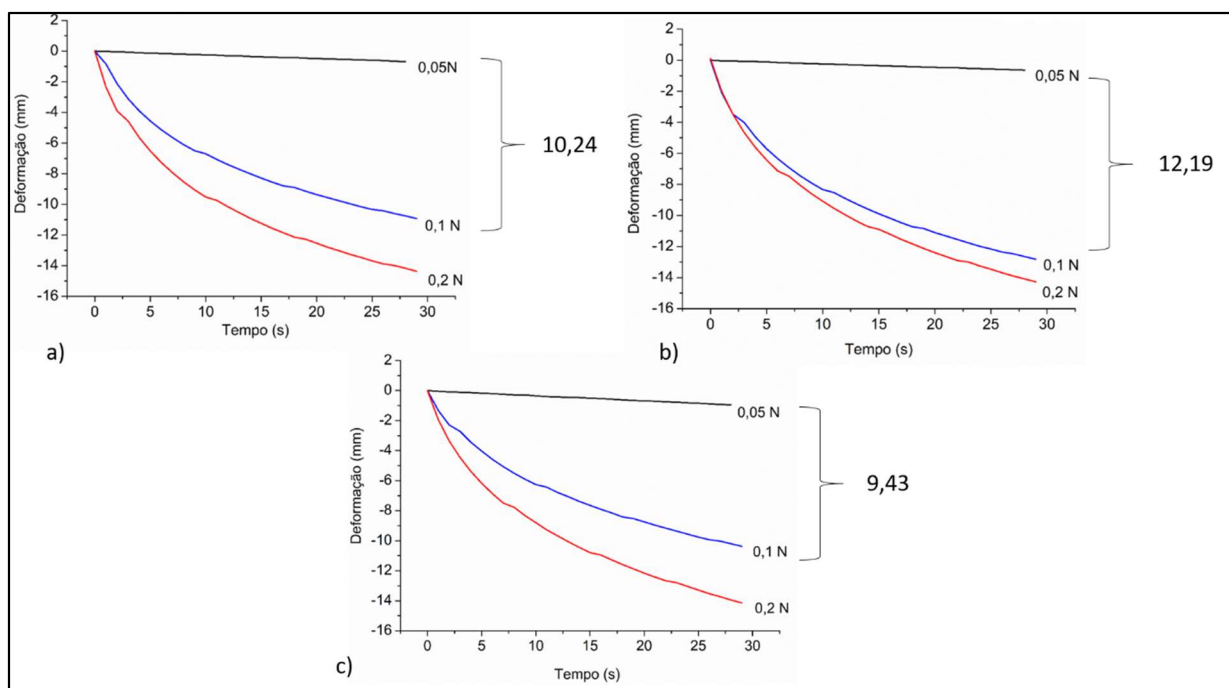


Figura 4.14. Gráficos deformação *versus* tempo obtidos pela análise de TMA; a) fibra F6; b) fibra F7 e c) fibra F8.

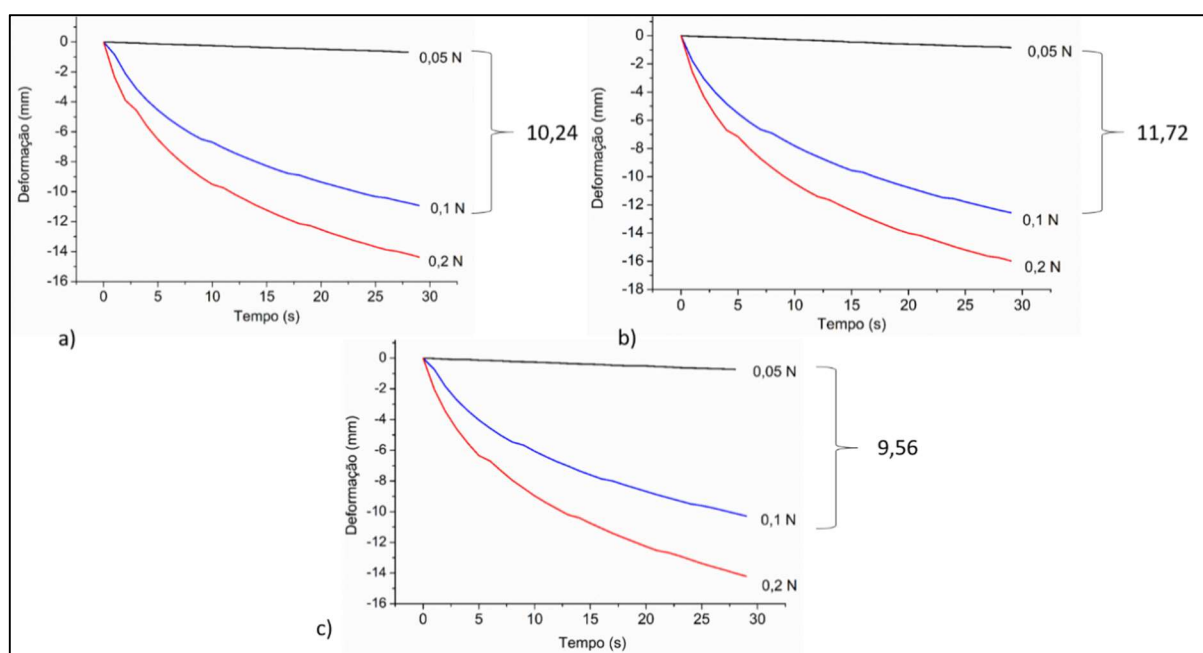


Figura 4.15. Gráficos deformação *versus* tempo obtidos pela análise de TMA; a) fibra F9; b) fibra F10 e c) fibra F11.

A análise dos gráficos acima para as fibras F3-F11 mediante a variação de deformação ocorrida entre a força aplicada de 0,1 e 0,05 N, permite observar que o aumento da concentração de PCL (6, 12 e 21 %) nas fibras leva a uma diminuição no valor da variação de deformação, como observado para as blendas F3, F4 e F5 – sem o fármaco Nimesulida. Os valores para as

blendas de PMMA/PCL na presença de Nimesulida obedeceram a mesma lógica, com exceção das fibras com 12 % de PCL que apresentaram maiores variações de deformação (F7 e F10). Isso pode ser explicado pois a presença do fármaco Nimesulida (que pode interagir com os polímeros) pode reduzir as interações polímero-polímero, levando a um alargamento da matriz polimérica e uma pequena mobilidade nas cadeias diminuindo as interações hidrofóbicas nas mesmas e assim diminuindo a elasticidade das fibras, fazendo com que se deformem mais, como acontece com outros relatos de adição de substâncias em matrizes poliméricas (LIMA *et al.*, 2007). Quando diferentes materiais são adicionados a blendas poliméricas as diferentes interações intermoleculares podem resultar em modificações de suas propriedades mecânicas: por exemplo, a formação de interações hidrofóbicas ou formação de ligação de hidrogênio alteram de modo diferenciado as propriedades mecânicas observadas nas fibras- a primeira pode gerar diminuição de elasticidade devido ao aumento de interações fracas enquanto a segunda pode fortalecer a fibra e atuar como reforço nas interações polímero-polímero (HEINY; SHASTRI, 2016) (DONG *et al.*, 2012).

4.2.5 Caracterização mecânica das fibras: ensaio de resistência à ruptura em têxturometro

O ensaio de resistência à ruptura foi realizado no têxturometro e teve como objetivo avaliar a capacidade das blendas (grupos F3 a F11) em resistir à ruptura quando comparados às fibras dos polímeros puros (grupos F1 e F2). Para tanto, foram avaliados os parâmetros de: resistência à perfuração (Rp) e alongamento na ruptura (Eb) calculados de acordo com as equações descritas no Capítulo 2. Os resultados são apresentados na tabela 4.4 que apresenta os valores (média de uma triplicata) de Rp e Eb para as fibras poliméricas.

Tabela 4.4. Valores de Rp e Eb obtidos do ensaio em texturômetro para as fibras obtidas por eletrofiação.

Fibras	Rp (MPa)	Eb (%)
F1	0,09 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,03 ^c
F2	0,60 ± 0,21 ^b	11,0 ± 2,23 ^d
F3	0,13 ± 0,02 ^a	0,42 ± 0,03 ^c
F4	0,07 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,24 ^c
F5	0,26 ± 0,02 ^a	0,49 ± 0,01 ^c
F6	0,13 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,08 ^c
F7	0,13 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,02 ^c
F8	0,24 ± 0,05 ^a	0,45 ± 0,23 ^c
F9	0,18 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,02 ^c
F10	0,22 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^c
F11	0,18 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,01 ^c

A análise estatística dos dados acima, usando o teste ANOVA e pós teste de Tuckey, com intervalo de confiança de $p < 0,05$ %, demonstrou significância apenas nos dados de Rp para a fibra de PCL (F2) quando comparada com as demais. As diferenças entre os valores encontrados para a fibra F1 e F2 nos permite observar que para a fibra de PCL o valor referente à resistência a perfuração (Rp) é bem maior do que para PMMA, fato já comprovado por sua maior elasticidade no ensaio de deformação *versus* tempo - TMA, diferente da fibra de PMMA que por apresentar menor resistência a perfuração é mais quebradiça. O valor de Eb, expresso em porcentagem, demonstra a energia aplicada no alongamento antes da ruptura. Vemos que há um maior valor de Eb para a fibra F2 (PCL) comparado a fibra F1 (PMMA) uma vez que esta é menos quebradiça. Em relação as blends de PMMA/PCL (F3-F11), podemos notar que o incremento de PCL em maior quantidade nas fibras produz melhora na propriedade mecânica, porém entre elas o resultado não foi significativo. Este fato pode se dar devido à alta robustez do equipamento utilizado, não sendo possível detectar pequenas mudanças nas fibras.

4.2.6 Caracterização da propriedade de barreira: permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é uma ferramenta importante para compreender os mecanismos pelos quais um fármaco pode ser difundido em uma matriz, quais as interações predominantes entre os polímeros formadores do sistema em estudo e por poder

indicar a proteção (como barreira) ou vulnerabilidade do fármaco nessa matriz (AKHGARI *et al.*, 2006) (BERTUZZI *et al.*, 2007).

Quando a lei de Fick ou Henry são obedecidas em um sistema, a permeabilidade pode ser entendida como o produto da difusividade e solubilidade. Deste modo uma vez que o vapor de água interaja fortemente com a estrutura polimérica, este pode gerar mudanças estruturais que levem a difusão ou solubilidade da amostra na matriz (BERTUZZI *et al.*, 2007). A permeabilidade é dependente de diversos fatores, sendo os mais importantes a natureza hidrofóbica ou hidrofílica do material, a presença de poros ou rachaduras e o efeito de adição de compósitos que podem alterar a natureza da barreira (GHANBARZADEH *et al.*, 2007) (RAJAMALLI; PRASAD, 2012) (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2008).

Os resultados para PVA das blendas poliméricas estão apresentadas na Tabela 4.5, bem como os valores das médias das espessuras das fibras e o desvio padrão (DP) respectivos. Pode ser observado que entre as fibras de PMMA puro e PCL puro (F1 e F2) há significância entre os valores de PVA ($p < 0,05$). A fibra de PCL se apresenta mais permeável ao vapor de água provavelmente por ser a fibra mais espessa e com menor arranjo em sua matriz demonstrando por suas fibras menos cilíndricas. Quando comparamos a fibra de PMMA (em maior proporção em todas as fibras) e as blendas com e sem a presença de fármaco (F3-F11), a única que se mostrou significativa foi a fibra F4 (com 12 % de PCL m/v e sem a presença do fármaco).

Tabela 4.5. Valores de permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e desvio padrão (DP) para as fibras obtidas por eletrofição.

Fibra	Espessura média (mm)	PVA (g.mm/h.m ² .Pa)	DP
F1	0,2538	3,52*10 ⁻⁵ a	7,47*10 ⁻⁶
F2	0,5021	6,17*10 ⁻⁵ a	1,25*10 ⁻⁵
F3	0,2423	2,82*10 ⁻⁵ a, b	2,62*10 ⁻⁶
F4	0,4832	6,27*10 ⁻⁵ a	1,10*10 ⁻⁵
F5	0,4554	5,56*10 ⁻⁵ a	8,56*10 ⁻⁶
F6	0,0887	2,14*10 ⁻⁵ a, b	6,67*10 ⁻⁷
F7	0,1581	3,46*10 ⁻⁵ a	8,37*10 ⁻⁶
F8	0,1223	2,63*10 ⁻⁵ a, b	8,15*10 ⁻⁶
F9	0,1150	2,43*10 ⁻⁵ a, b	1,04*10 ⁻⁵
F10	0,1399	3,00*10 ⁻⁵ a, b	1,64*10 ⁻⁵
F11	0,1398	4,56*10 ⁻⁵ a	1,11*10 ⁻⁵

É possível observar que apesar de não serem todos os valores significativamente diferentes, os valores de permeabilidade ao vapor de água nas fibras com a presença do fármaco se tornaram menores quando comparados as mesmas fibras na ausência do fármaco. Este fato também foi observado no ensaio mecânico (TMA), em que a presença do fármaco tornou maior sua deformação frente à tensão. Nos ensaios mecânicos foi possível associar a maior deformação no tempo às interações polímero-fármaco (uma vez que o fármaco Nimesulida também é altamente hidrofóbico) e a geração de mobilidade nas cadeias poliméricas que permitiram uma maior deformação sem reestabelecimento do arranjo original. Nos ensaios de permeabilidade, do mesmo modo, a presença do fármaco hidrofóbico na matriz polimérica torna mais difícil a pervaporação do vapor de água na fibra, uma vez que ela pode se encontrar mais hidrofóbica em seu interior e com melhor propriedade de barreira. Apesar do ensaio de ângulo de contato relatar uma diminuição pequena na hidrofobicidade, estas fibras ainda são muito hidrofóbicas, fato relatado por seus ângulos de contato altos entre as gotículas de água e as fibras nesse ensaio. Este fato já era esperado devido à baixa solubilidade de Nimesulida em água sendo necessário um controle de pH ou adição de agentes dispersantes no meio para sua solubilização. O valor de baixa permeação ao vapor d'água pode indicar um modelo de difusividade e solubilidade baixo para os sistemas, o qual só poderá ser comprovado em ensaios posteriores de liberação *in vitro* e que pode sugerir a utilização deste sistema, não como um sistema de liberação via oral ou difusa mas sim transdérmico ou como recobrimento de "stents", por exemplo.

4.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO FÁRMACO NIMESULIDA

O ensaio de liberação *in vitro* para as blendas contendo o fármaco Nimesulida foi realizado como uma análise prévia para se verificar a possibilidade deste sistema em atuar na liberação controlada. Após o estudo morfológico das fibras que apresentaram uniformidade, ausência de poros e deformações; mecânico que demonstrou propriedades mecânicas superiores para as blendas comparadas ao polimetilmetacrilato puro; e térmico que demonstrou a caracterização térmica do sistema sem perda de estabilidade, as blendas descritas podem ser testadas quanto a sua aplicação em sistemas de liberação de fármacos. Ensaio posteriores deverão ser realizados considerando-se a hidrofobicidade do material e o melhor meio de associação, como por exemplo a forma adesiva ou transdérmica.

Para aplicação dos ensaios *in vitro* atuais para sistemas de liberação (mesmo para sistemas adesivos ou transdérmicos), o primeiro passo é a avaliação da difusividade do fármaco avaliado

no meio testado, uma vez que para sistemas de liberação os modelos associados à estes sistemas se enquadram em uma das categorias que se seguem: difusão, liberação por processo de ativação ou desagregação/erosão polimérica (MANADAS; EUGÉNIA; VEIGA, 2002) (CILURZO *et al.*, 2008) (PAUDEL *et al.*, 2010).

Para tanto, o ensaio prévio de liberação *in vitro* foi realizado com as fibras contendo 30 e 60 mg do fármaco Nimesulida em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. Primeiramente foi obtida a curva de calibração para a Nimesulida em tampão PBS pH 7,4 como mostrado na Figura 4.16.

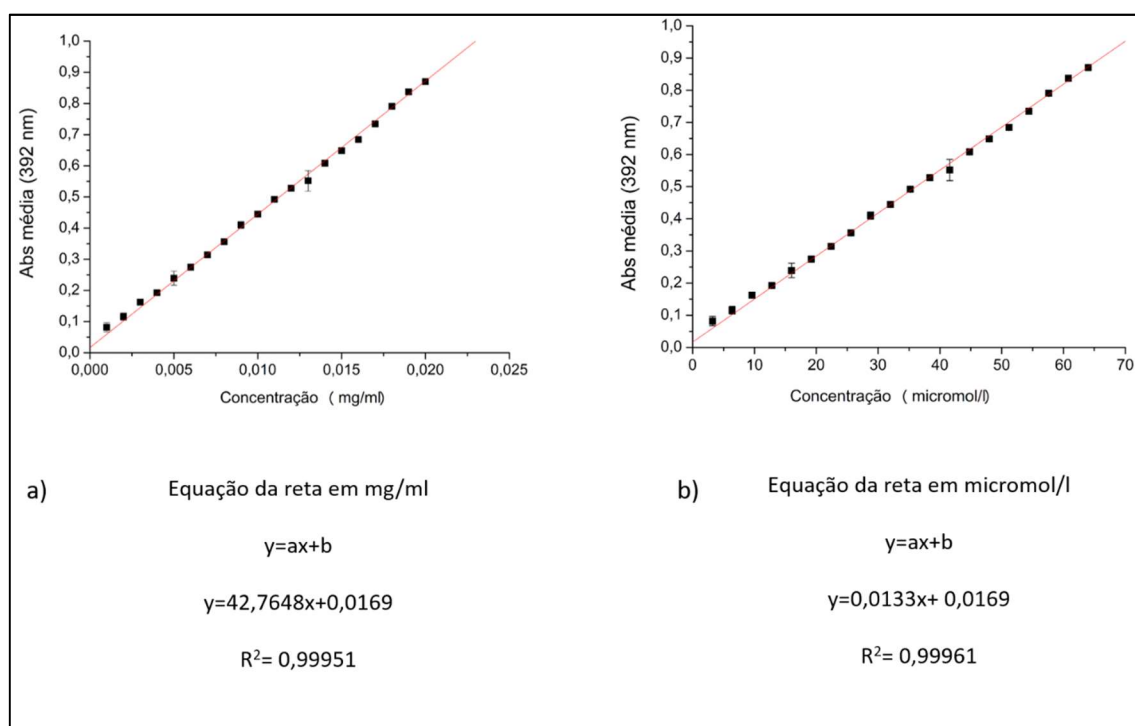


Figura 4.16 Representação das curvas de calibração para solução de Nimesulida em tampão PBS pH 7,4 a) em mg/mL; b) micromol / L.

As curvas referentes ao ensaio de liberação *in vitro* para as fibras de 30 e 60 mg de Nimesulida foram obtidas com base nas leituras de absorbância a 392 nm para as soluções no primeiro dia durante 24 h seguidas e nos dias posteriores em intervalos de 24 h. Os gráficos para a liberação das fibras foram plotados como percentual de liberação acumulado *versus* tempo e estão apresentados nas Figuras 4.17 e 4.18.

É possível observar que o grupo de fibras contendo 30 mg de Nimesulida apresenta liberação muito semelhante ao grupo contendo 60 mg, sendo a velocidade de liberação maior para as fibras F7 e F10 (12 % m/v de PMMA e 12 % m/m de PCL com 30 e 60 mg de Nimesulida respectivamente). A fibra com essas mesmas proporções e sem o fármaco (F4), foi a que apresentou maior resultado no ensaio de permeabilidade ao vapor d'água podendo ser

esta uma possível explicação para sua liberação mais rápida: a maior permeação da solução tampão no interior da fibra leva a saída do fármaco por difusão com maior velocidade. Porém, é possível notar que todas as fibras apresentam uma liberação controlada sendo necessários ensaios posteriores para a quantificação do fármaco na matriz bem como o estudo do seu perfil de liberação. Como as liberações iniciais foram muito semelhantes, nos ensaios posteriores foi fixada a quantidade de 30 mg de Nimesulida para adição nas fibras.

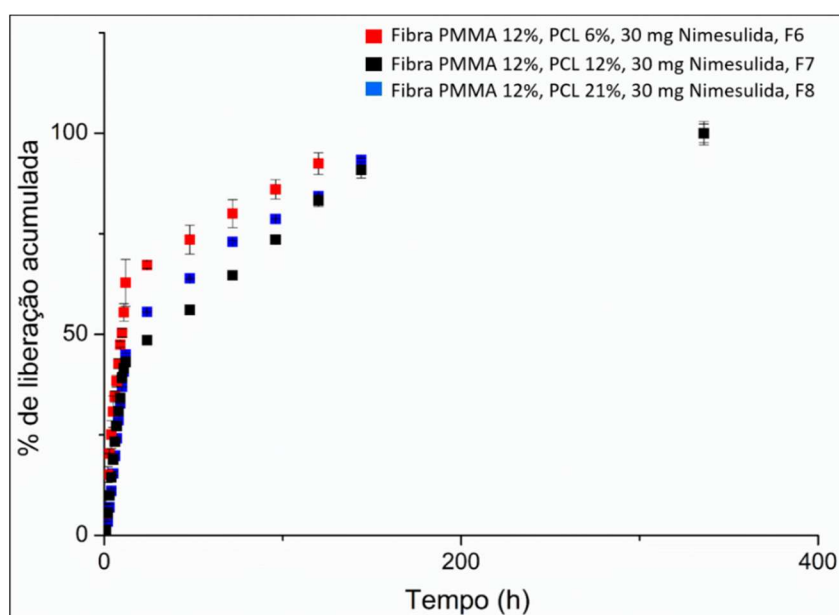


Figura 4.17. Curva de porcentagem de liberação acumulada *versus* tempo para as fibras F6-F8 no ensaio de liberação *in vitro* em tampão PBS pH 7,4.

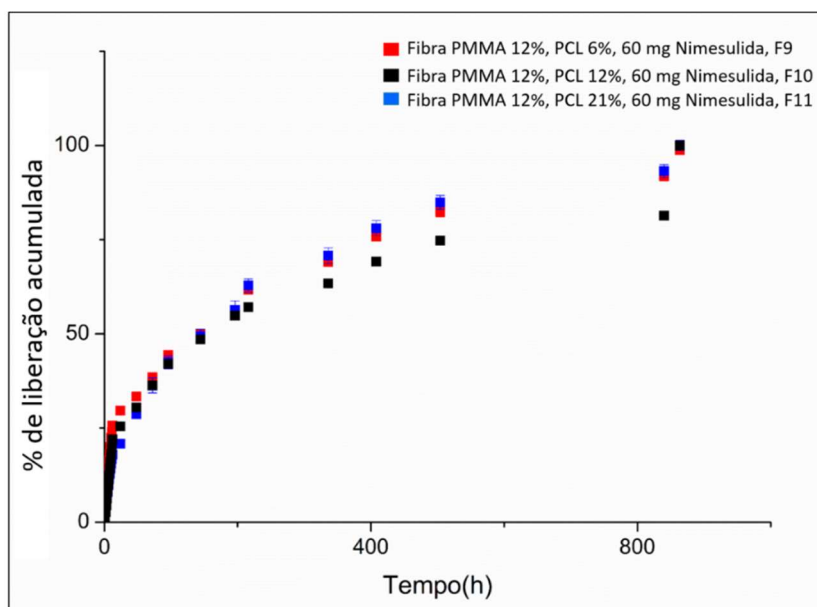


Figura 4.18. Curva de porcentagem de liberação acumulada *versus* tempo para as fibras F9-F11 no ensaio de liberação *in vitro* em tampão PBS pH 7,4.

4.4 FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA DE PMMA E POLIACILHIRAZONAS

Após a síntese e caracterização dos polímeros de acilhidrazonas **5A** e **5B**, descritos no Capítulo 3, objetivou-se a formação de blendas poliméricas obtidas por eletrofiação a partir das poliacilhidrazonas e do polímero polimetilmetacrilato (PMMA) (com propriedades de fibra previamente conhecidas e descritas neste capítulo). A formação de fibras por eletrofiação unicamente a partir das poliacilhidrazonas não se tornou um caminho viável uma vez que a quantidade em massa deste polímero para a eletrofiação seria muito alta e estes apresentam baixa solubilidade em solventes usuais para eletrofiação. Diante desse fato, optou-se por dispersar o polímero **5B** (que apresenta baixa solubilidade em DMSO) e assim obter a fibra polimérica de PMMA com este polímero (como estrutura de reforço) por eletrofiação, uma vez que a solução formada se mostrou muito estável. O mesmo não pode ser realizado com o polímero **5A** uma vez que este apresenta baixíssima solubilidade em DMSO.

Sistemas dispersos já são descritos na literatura para a formação de fibras poliméricas por eletrofiação podendo atuar como nanocompósitos, reforçando a estrutura de fibras poliméricas ou melhorando suas propriedades mecânicas (DONG *et al.*, 2012) (KAMPEERAPAPPUN, 2016). No caso das poliacilhidrazonas objetivou-se a formação das blendas poliméricas com o intuito de se avaliar as propriedades mecânicas e térmicas desta associação bem como estudar, posteriormente, a citotoxicidade do sistema obtido e sua possível aplicação na liberação do fármaco Nimesulida. Também será possível avaliar e comparar a possível atividade biológica da poliacilhidrazona isolada e inserida na fibra polimérica.

A análise da morfologia das fibras foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) com um aumento de 540 e 2000 X que mostrou a uniformidade das fibras, bem como ausência de gotas ou fusos e pode fornecer o diâmetro médio das fibras obtidas (em média de 5 valores medidos) como $2,584 \mu\text{m} \pm 0,18$. É possível notar a diferença na forma da fibra obtida: a presença do solvente dimetilsulfóxido menos volátil na formação da fibra, levou a fibras mais achatadas e menos cilíndricas do que comparado às fibras de PMMA obtidas em dimetilformamida. Porém, não se observam a formação de poros, rachaduras ou fusos nas fibras.

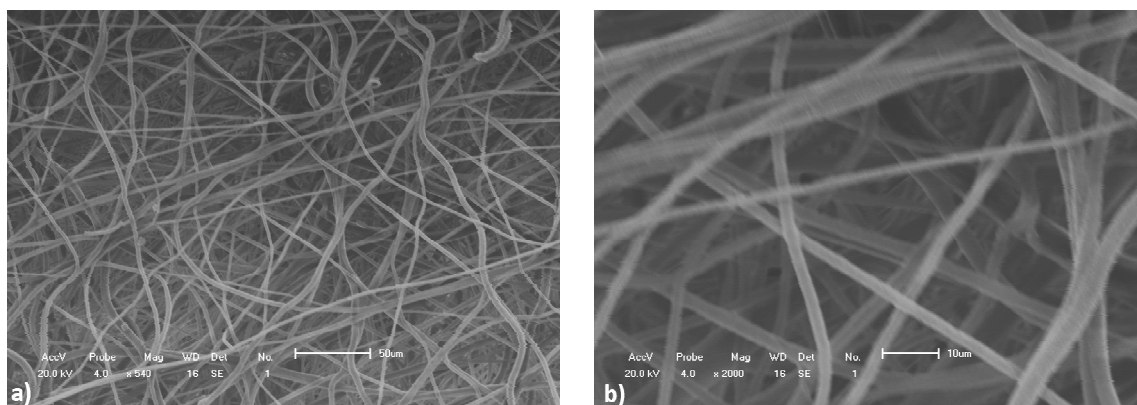


Figura 4.19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a fibra PMMA-**5B** obtida por eletrofiação; a) aproximação de 540X e b) aproximação de 2000X.

Foi realizada também a medida do ângulo de contato para a fibra de PMMA-**5B** em comparação à fibra de PMMA isolado. Neste caso, valores dos ângulos de contato revelam aspectos sobre a hidrofilicidade ou hidrofobicidade dos materiais, uma vez que duas medidas são realizadas com água, e são dados como médias de 7 valores. O ângulo de contato da fibra de PMMA puro se apresentou como $148^\circ \pm 6$ e para a fibra de PMMA-**5B** este valor foi de $116^\circ \pm 5$. Podemos perceber que a presença do polímero **5B** na fibra de PMMA a torna mais hidrofílica e assim diminui seu ângulo de contato com água como observado na Figura 4.20. Este fato já era esperado uma vez que a presença de grupos polares no polímero **5B** aumentam a hidrofilia do material.

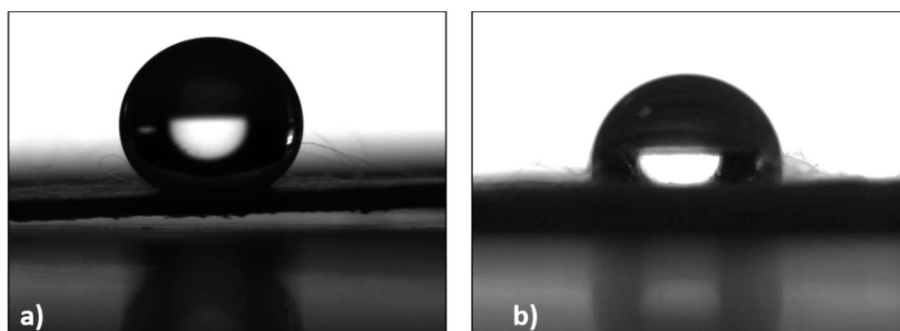


Figura 4.20. Imagem de gotas de água na superfície das microfibras; a) fibra de PMMA puro, b) fibra de PMMA-**5B**.

A análise do espectro FTIR-ATR de sobreposição para as fibras de polimetilmetacrilato em comparação à fibra do polímero **5B** e da fibra de associação de PMMA-**5B** (Figura 4.21) não demonstra diferenças significativas para a fibra de associação comparada à fibra de PMMA (presente em maior proporção na fibra). Este fato pode se dar devido à baixa concentração do polímero **5B** na fibra como também à sua localização mais interna na estrutura da mesma. Como o FTIR-ATR analisa a superfície do material, compostos presentes na estrutura interna da fibra são dificilmente identificados. Porém, o espectro demonstra a presença das bandas de PMMA

e da banda referente ao ν N-H do polímero **5B** próximo a 3400 cm^{-1} ausente na fibra de PMMA isolado. Esta banda, diferentemente do polímero isolado, se apresenta como uma única banda fato que pode ser atribuído à formação de ligação de hidrogênio entre os grupos $-\text{NH}$ do polímero **5B** e os grupos terminais ésteres de PMMA. Este fato pode ser um indicativo da associação de PMMA e **5B** nas fibras obtidas por eletrofiação.

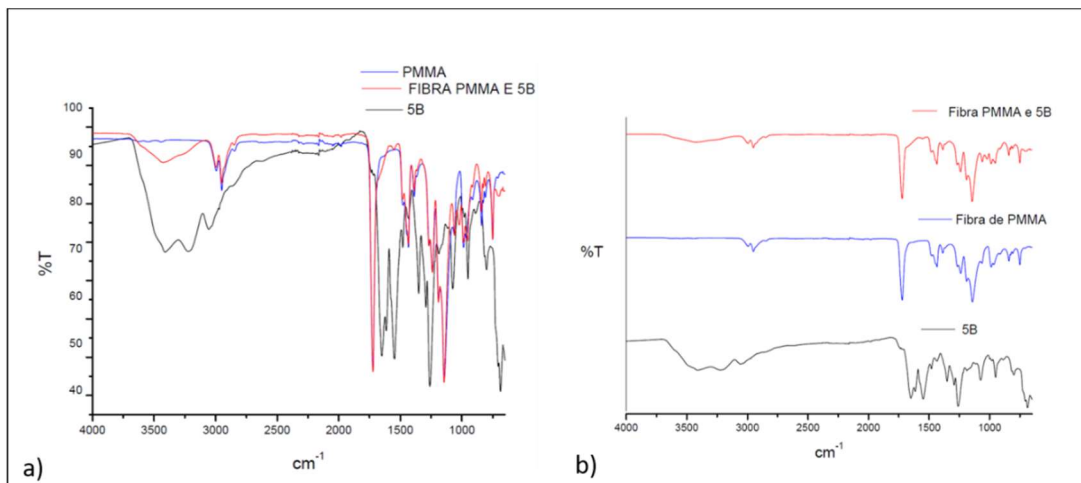


Figura 4.21. Espectro FTIR-ATR na região de 4000 a 650 cm^{-1} ; a) espectro de sobreposição para as fibras de PMMA puro, PMMA-**5B** e do polímero **5B**; b) espectros isolados para a fibra de PMMA-**5B**, PMMA puro e para o polímero **5B**.

Ainda com o objetivo de caracterizar a fibra de PMMA-**5B** foi realizada a análise da termogravimetria (TG) e a termogravimetria derivada (dTG) para a fibra obtida. Esta análise permitiu comparar os eventos térmicos ocorridos entre a fibra de PMMA puro e a fibra de PMMA com o polímero **5B**, uma vez que os eventos associados ao polímero **5B** ainda não são descritos na literatura. A decomposição térmica completa da fibra de PMMA puro já foi discutida neste capítulo, porém podemos observar que a presença do polímero **5B** desloca os valores de dTG do PMMA (um primeiro evento em $265\text{--}296\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um segundo evento em $325\text{--}379\text{ }^{\circ}\text{C}$) para valores de $296\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $339\text{--}393\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Estes eventos estão associados a despolimerização (gerando os monômeros) em temperaturas mais baixas e quebra dos monômeros em temperaturas mais altas. Com a elevação da temperatura para estes eventos na presença do polímero **5B** podemos sugerir que ocorra uma proteção térmica dada pela presença deste polímero, que pode ser ocasionada devido a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre o grupo $-\text{NH}$ do polímero **5B** e os ésteres terminais da cadeia de polimetilmetacrilato (como sugerido por FTIR-ATR). A presença de ligações de hidrogênio em blendas poliméricas aumentam a rigidez da cadeia e como consequência, sua temperatura de decomposição térmica (DONG *et al.*, 2012).

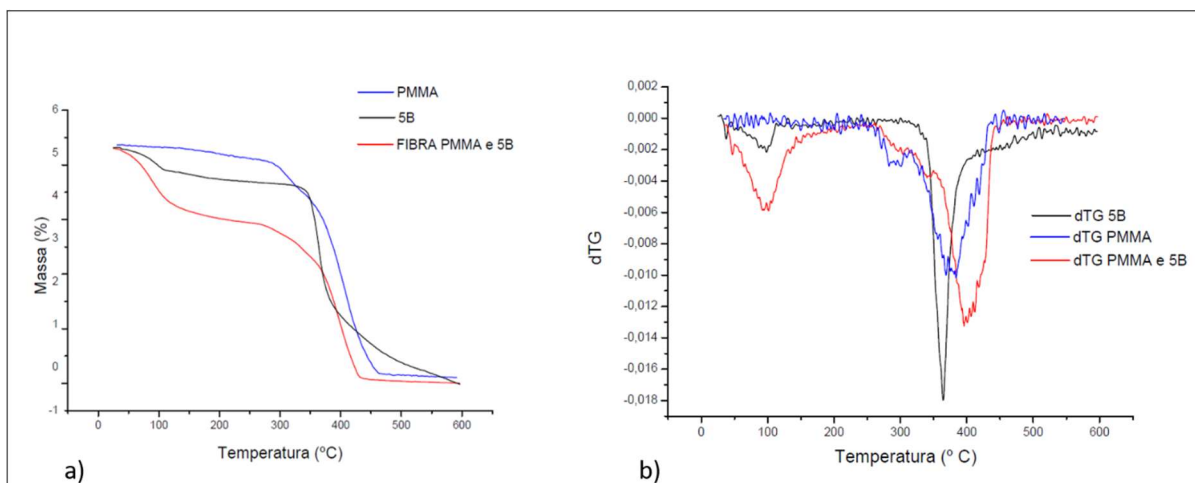


Figura 4.22. Análise Térmica para a fibra PMMA-5B em comparação à PMMA puro e o polímero 5B puro, a) curvas TG na faixa de 37-600°C; b) curvas dTG de sobreposição.

O ensaio de permeabilidade ao vapor d'água também foi realizado para a fibra PMMA-5B que demonstrou um valor de PVA de $5,56 \times 10^{-5}$ comparado à $3,93 \times 10^{-5}$ para a fibra de PMMA puro, se mostrando então (numericamente) mais permeável ao vapor d'água. Porém a análise estatística para estes valores não demonstrou significância. O fato de não serem significativamente diferentes pode demonstrar que apesar da inserção de grupos hidrofílicos no polímero, a fibra se comporta de modo muito parecido a fibra de PMMA puro, possivelmente por prevalecerem interações hidrofóbicas.

A análise termomecânica revelou que, como sugerido por FTIR-ATR e análise térmica existe a presença de forças intermoleculares entre o grupo -NH do polímero 5B e os ésteres terminais da cadeia de polimetilmetacrilato, provavelmente ligações de hidrogênio que aumentam a rigidez da cadeia e como consequência fornecem um maior valor de variação de deformação no tempo como observado a Figura 4.23.

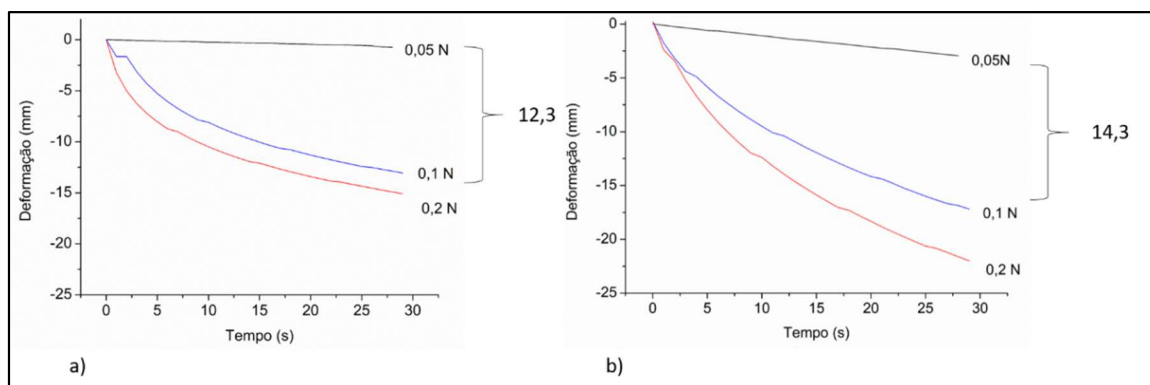


Figura 4.23. Análise termomecânica deformação *versus* tempo para a) fibra PMMA puro e b) fibra de PMMA-5B.

4.5 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL CAPACIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS HIDRAZIDAS INTERMEDIÁRIAS

Após a obtenção dos possíveis polímeros de acilhidrazonas **5A** e **5B**, suas caracterizações e aplicação do polímero 5B na formação de uma fibra polimérica com PMMA, objetivou-se a avaliação do potencial perfil de inibição da inflamação para as hidrazidas intermediárias 3a e 3b, uma vez que não existem relatos de sua avaliação na literatura e ambas se apresentam solúveis em solventes biológicos como o tampão fosfato salino (PBS). O método utilizado para a avaliação da potencial capacidade anti-inflamatório foi o método de inibição da desnaturação proteica de albumina, descrito por Mizushima e Kobayashi (MIZUSHIMA; KOBAYASHI, 1968) e adaptado por diversos autores (SAKAT SACHIN; TUPE PREETI; JIVEKAR ARCHANA, 2010); (OSMAN *et al.*, 2016) (KUMARI *et al.*, 2015).

A inflamação pode ser considerada causada pela liberação de substâncias químicas denominados mediadores pró inflamatórios, que atuam como sinalizadores e podem gerar danos teciduais e celulares (MEDZHITOV, 2008). Esses mediadores por sua vez, são liberados como uma resposta do corpo à presença de agentes inflamatórios, originários de injúrias físicas, aquecimento tecidual, infecções microbianas, irritações teciduais ou celulares, e a liberação destes mediadores é o indicativo de que as células precisam reagir a estes agentes na tentativa de eliminá-los, gerando então o processo inflamatório (KASSUYA; PIORNEDO, 2013). Como resposta, ocorre a sinalização e geração de sintomas específicos desse processo dentre eles dor, edema, rubor, calor podendo chegar a perda de função tecidual. O processo inflamatório pode ser associado a patologia de diversos tipos de doenças, dentre elas artrite, artrose ou até o câncer. Os fármacos anti-inflamatórios e do mesmo modo moléculas que apresentem um perfil anti-inflamatório, podem atuar sob diversos mecanismos de ação para minimizar os efeitos da inflamação. Dentre eles estão a desidratação de tecidos lesados, vasoconstrição, a redução da atividade de citocinas pró inflamatórias ou a inibição de enzimas que levam a produção dos mediadores pró inflamatórios importantes como prostaglandinas e tromboxanos, como as ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). Os fármacos responsáveis pela inibição das enzimas COX-1 e COX-2 são denominados anti-inflamatórios não estereoidais (FIGUEIREDO; ALVES, 2015)(MEDZHITOV, 2010)(DINARELLO, 2010)(MEDZHITOV, 2008).

Como relatado na literatura, a desnaturação proteica é também uma parte do processo inflamatório: os tecidos que sofreram uma injúria podem levar à ação de enzimas capazes de desencadear a desnaturação de proteínas celulares ou até mesmo levar estas a sofrerem clivagem via o aumento de temperatura intracelular. Estas proteínas por sua vez, podem perder

sua função, penetrarem tecidos e até liberarem junto com sua desnaturação espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de induzir necrose celular. Desde modo, o uso de substâncias capazes de inibir a desnaturação proteica pode levar a melhora dos sintomas da inflamação e impedir em algum ponto, o avanço da mesma. Anti-inflamatórios não estereoidais como ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetil salicílico (AAS) ou nimesulida são conhecidos por atuarem na inibição da desnaturação proteica. Apesar desta não ser uma metodologia única para se avaliar a capacidade de uma molécula em sua atuação no processo inflamatório, e nem mesmo a mais usual, esse método se mostra como um bom indício inicial de análise, uma vez que é rápido, de baixo custo, *in vitro*, e demonstra resultados reprodutíveis na literatura (MIZUSHIMA; KOBAYASHI, 1968) (OSMAN *et al.*, 2016).

O ensaio para avaliação da capacidade inibitória de desnaturação proteica foi realizado como descrito no Capítulo 2, utilizando-se albumina como proteína modelo e ácido acetilsalicílico e nimesulida como fármacos padrão de inibição (controle positivo). A Figura 4.24 exemplifica a diferença qualitativa da solução contendo albumina sem e com a presença do fármaco: do lado esquerdo da figura a solução contendo apenas albumina que se encontra desnaturada e turva após aquecimento; do lado direito: a solução contendo albumina e o fármaco AAS que mesmo após aquecimento levou a proteção da albumina quanto à desnaturação.



Figura 4.24. Imagem qualitativa do ensaio de inibição da desnaturação proteica de albumina. Lado esquerdo: solução contendo apenas albumina; lado direito: solução contendo albumina e AAS.

Os resultados mostrados na Figura 4.25 demonstram que as hidrazidas 3a e 3b apresentam, *in vitro*, uma capacidade de inibição de desnaturação muito próxima à dos fármacos padrão, com cerca de 90 % de inibição, fato que sugere uma possível ação destas hidrazidas na concentração de 50 µg/ml. Estudos posteriores devem ser conduzidos para se chegar a um valor de concentração inibitória mínima de 50 % (IC₅₀) para as hidrazidas em questão.

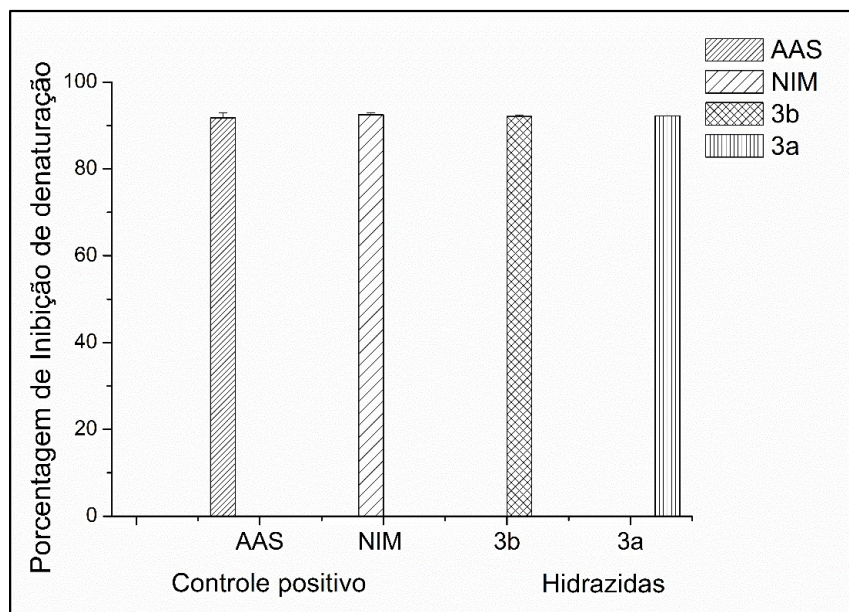


Figura 3. Gráfico do percentual de inibição de desnaturação para as hidrazidas **3a** e **3b** em comparação aos fármacos padrão ácido acetilsalicílico e nimesulida, todos em concentrações de 50 µg/mL com leituras de absorvância realizadas em UV-VIS 660nm.

4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (ENSAIO DE CITOTOXICIDADE) PARA AS BLENDA DE PMMA/PCL E PARA AS HIDRAZIDAS 4A E 4B

O ensaio de viabilidade celular para as blendas e para as hidrazidas teve como objetivo avaliar se os polímeros (na forma de fibras poliméricas) e as hidrazidas sintetizadas apresentavam toxicidade celular. Os polímeros PCL e PMMA não apresentam elevadas toxicidades celulares como relatado na literatura sendo considerados polímeros biocompatíveis (MUNJ *et al.*, 2014). O ensaio de viabilidade celular foi baseado no método colorimétrico MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Nesse método, a atividade metabólica das células é testada, uma vez que é indicativo da atividade de enzimas mitocondriais desidrogenases que podem reduzir este sal de tetrazólio (MTT) a uma forma insolúvel do mesmo, denominado sal de formazan de coloração púrpura que atua como marcadores da presença de células vivas nas placas durante o ensaio de citotoxicidade. Deste modo, a presença de coloração púrpura nos poços da placa de ensaio reflete a presença de células vivas, e como este sal não é solúvel as células precisam sofrer quebra para que a quantificação deste sal (e então uma associação indireta de sua quantificação à presença do quantitativo de células vivas) seja realizada. O efeito da ação celular sob o reagente MTT é o resultado de que mesmo na presença dos polímeros ou hidrazidas, alterações nas bases celulares não foram sofridas, como modificações mitocondriais ou integridade da membrana plasmática,

fatos que poderiam levar a morte celular (CARVALHO *et al.*, 2016) (LIU, XUEMEI *et al.*, 2018).

Os resultados para as blendas de PMMA e PCL demonstraram que a associação dos polímeros durante o processo de eletrofiação não altera a viabilidade celular do material a ponto de torna-los tóxicos: a Figura 4.25 demonstra que tanto PMMA como PCL e suas blendas apresentaram viabilidade celular superior a 50 %, sendo que a presença do fármaco nas fibras incrementa uma diminuição na viabilidade celular. Do mesmo modo, na Figura 4.26 são apresentados os resultados para as hidrazidas e pode-se observar que a viabilidade celular foi maior que 50 % sendo a hidrazida **3b** ainda mais viável ao crescimento celular, sendo considerada menos tóxica.

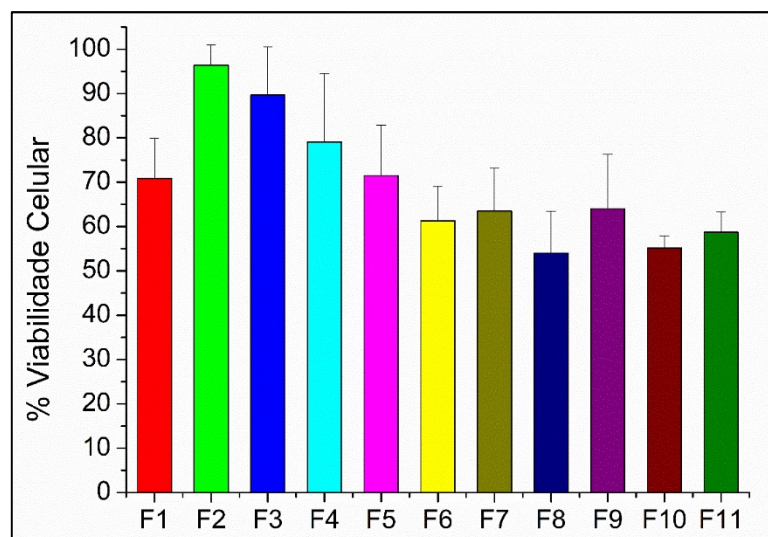


Figura 4.26. Gráfico do percentual de viabilidade celular para as fibras de PMMA e PCL puros e blendas dos dois polímeros sem o fármaco Nimesulida e com 30 e 60 mg do fármaco.

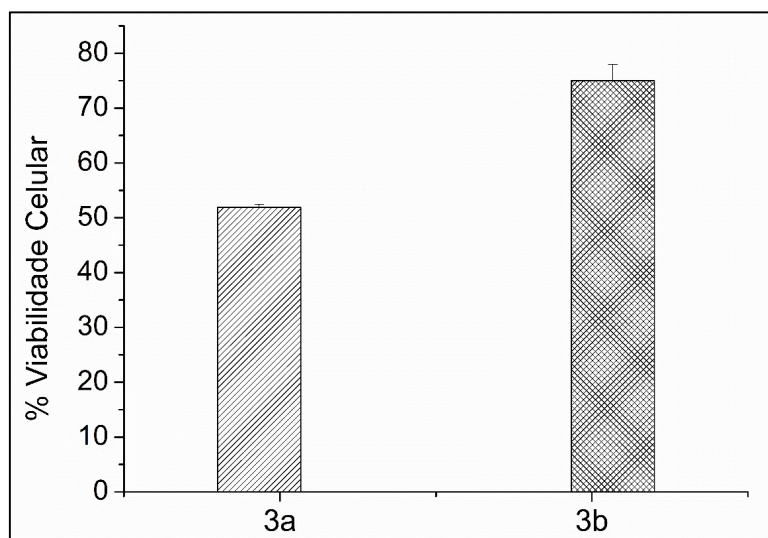


Figura 4.27. Gráfico do percentual de viabilidade celular para as hidrazidas **3a** e **3b**.

CÁPITULO 5

**FORMAÇÃO DAS FIBRAS *CORE-SHEATH* A PARTIR DE
PMMA E PCL PARA A UTILIZAÇÃO COMO SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-FIBRAS COAXIAIS

5.1 FORMAÇÃO DAS FIBRAS COAXIAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO

As fibras com morfologia de casca/centro designadas *core-sheath* ou por similiaridade designadas coaxiais ou *core-shell*, foram formadas a partir de Polimetilmetacrilato (PMMA) e Policaprolactona (PCL) sem e com a presença do fármaco Nimesulida. As mesmas foram obtidas por eletrofiação em colaboração com a University of Portsmouth, Reino Unido, durante o período de estágio de doutoramento sanduíche, seguindo os parâmetros descritos no capítulo *Materiais e Métodos*. Para facilidade na designação, as fibras foram nomeadas como abaixo:

- PMMA na parte interna (*core*) da fibra e PCL na parte externa (*sheath*) sem a presença do fármaco Nimesulida como: **PMMA (*core*) / PCL (*sheath*)** sem fármaco;
- PMMA e Nimesulida juntos na parte interna (*core*) da fibra e PCL na parte externa (*sheath*) como: **PMMA-NIM (*core*) / PCL (*sheath*)**;
- PMMA na parte interna (*core*) da fibra e PCL junto com Nimesulida na parte externa (*sheath*) como: **PMMA (*core*) / PCL-NIM (*sheath*)**.

Para a formação das fibras coaxiais, uma etapa de extrema importância é a obtenção dos parâmetros corretos que permitam a eletrofiação das duas substâncias diferentes com estabilidade, na formação de uma única fibra com morfologia *core-sheath*. Para tanto, assim como para as fibras uniaxiais, o ajuste dos parâmetros e bem como a formação do cone de Taylor, são etapas cruciais na formação de fibras o mais uniformes possível, sem a formação de gotas ou deformações. Além disso, a formação do cone de Taylor muitas vezes pode ser um indicativo da formação de fibras *core-sheath* uma vez que em alguns casos é possível distinguir as duas soluções formadores da fibra na imagem do cone. Deste mesmo modo, análises de microscopia óptica durante a eletrofiação podem ajudar a indicar a obtenção destes sistemas. A Figura 5.1 mostra a imagem fotográfica para o cone de Taylor na formação das fibras coaxiais de PMMA e PCL e a imagem em microscópio óptico para essas fibras.

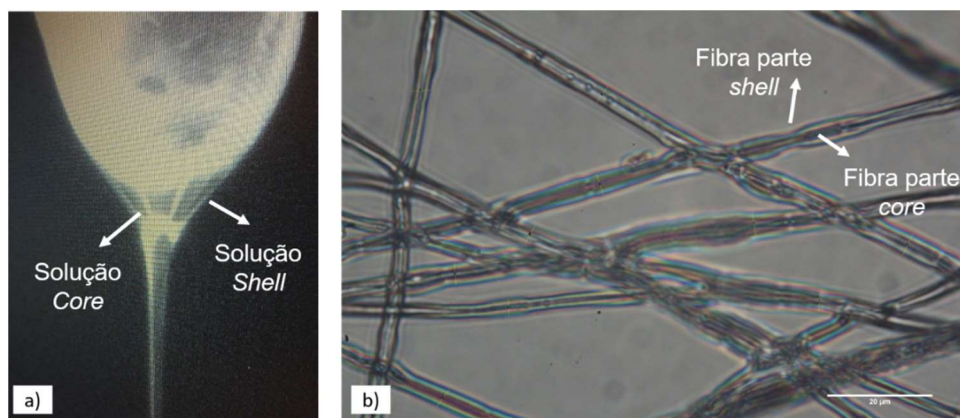


Figura 5.1. a) Imagem fotográfica do Cone de Taylor durante o processo de eletrofiação das fibras *core-sheath*; b) Imagem de microscopia óptica obtida durante o processo de eletrofiação.

Fonte: SIMÕES, MARIA CECILIA RODRIGUES, et.al. Journal of the Materials Science, v.54, n.7, 2019.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS OBTIDOS POR ELETROFIAÇÃO

5.1.1 Caracterização de superfície das fibras coaxiais: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ângulo de contato

Após a obtenção das fibras pela técnica de eletrofiação e análise em microscopia óptica, a mesmas foram submetidas a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A Figura 5.2 mostra as imagens obtidas para as fibras com magnitude de 700 X. Pode-se observar que as fibras apresentam uniformidade em toda a extensão de sua superfície como também observado para as fibras uniaxiais. A fim de se comprovar a existência de fibras na conformação *core-sheath*, foi realizada em seguida a microscopia eletrônica de transmissão (MET), esperando-se encontrar (através da diferença de massa molecular dos polímeros existentes e da contribuição que cada um deles pode fornecer na absorção eletrônica nas duas diferentes regiões das fibras, caso elas existam) diferentes tons de coloração na microscopia para essas regiões, a fim de distingui-las. A Figura 5.3 mostra a imagem de MET para as fibras coaxiais. A presença de duas regiões distintas em tonalidades diferenciadas na fibra é um indicativo da formação de fibras coaxiais em toda a extensão das fibras obtidas, e confirma a configuração *core-sheath*. O diâmetro médio encontrado para as fibras coaxiais com Nimesulida localizada na parte interna (*core*) foi de 4.48 ± 0.45^a μm e para as fibras contendo Nimesulida na parte externa (*sheath*) o diâmetro médio encontrado foi de 3.83 ± 0.34^b μm . Os resultados encontrados foram obtidos por análise no programa Image J, com média de 60 medições. Em comparação às fibras uniaxiais de PMMA e PCL, é possível se

observar valores bem maiores de diâmetro das fibras (diâmetro médio da fibra de PMMA e PCL de 1.49 ± 0.24^c e 1.75 ± 0.13^d μm , respectivamente), fato já esperado pela própria conformação *core-sheath* como relatado na literatura (OLIVEIRA; SUAREZ; ROCHA; DE CARVALHO TEIXEIRA; CORTÉS; *et al.*, 2015). As medidas foram realizadas como uma média de 60 valores e em seguida foi realizada a análise estatística.

A análise estatística dos resultados de diâmetro das fibras coaxiais, bem como para as demais análises (PVD, Rp, Eb e ângulo de contato), foram realizados pelo método ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Tuckey. As letras sobrescritas designam diferentes grupos de significância utilizados no teste de Tuckey, sendo os valores foram analisados com nível de significância de $p < 0,05\%$. Os resultados foram obtidos no programa GraphPad Prism 5.0.

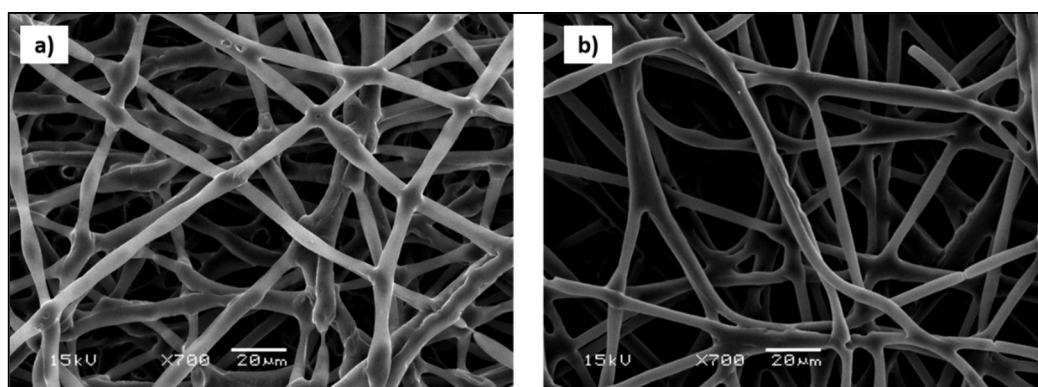


Figura 5.2. a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura para a fibra coaxial PMMA-NIM (*core*) / PCL (*sheath*); b) Imagem de microscopia eletrônica de varredura para a fibra coaxial PMMA (*core*) / PCL-NIM (*sheath*);

Fonte: SIMÕES, MARIA CECILIA RODRIGUES, *et.al.* Journal of the Materials Science, v.54, n.7, 2019.

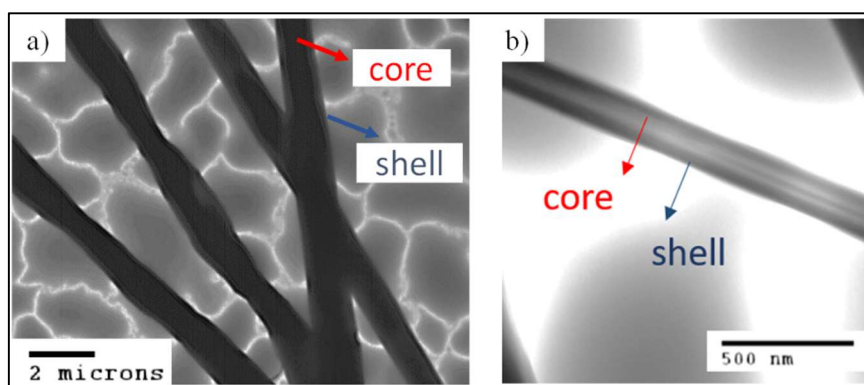


Figura 5.3. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para a fibra coaxial PMMA-NIM (*core*) / PCL (*sheath*) com magnitude de 800X; b) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para a fibra coaxial PMMA (*core*) / PCL-NIM (*sheath*) com magnitude de 3000X.

Fonte: SIMÕES, MARIA CECILIA RODRIGUES, *et.al.* Journal of the Materials Science, v.54, n.7, 2019.

A técnica da medida do ângulo de contato de uma gotícula de água com a superfície das fibras foi realizada com o objetivo de se estudar a hidrofobicidade/hidrofilicidade do sistema. Como os polímeros formadores da fibra são hidrofóbicos, já se esperava um ângulo de contato alto como obtido anteriormente para as fibras monoaxiais. Porém, o que se observou foi uma diminuição significativa no valor do ângulo de contato para as fibras coaxiais (usando o teste ANOVA e pós teste de Tuckey com intervalo de confiança de $p < 0.05$ % para média de 10 medidas) quando comparadas às fibras uniaxiais. Do mesmo modo, quando comparadas à blenda F8 descrita no Capítulo 4 (blenda com valor mais alto de concentração de PCL e mais próximo da concentração de PCL nas fibras coaxiais) as fibras coaxiais também se mostraram menos hidrofóbicas que as monoaxiais. Tal fato pode estar associado a morfologia *core-sheath* e ao maior espaçamento existente entre as cadeias poliméricas bem como a existência de duas áreas distintas (centro e casca) de polímeros diferentes, que podem permitir um maior contato com a gotícula de água e consequentemente uma maior permeação desta na matriz. Tal fato pode ser corroborado com os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVD).

Tabela 5.1. Valores dos ângulos de contato médio entre as fibras obtidas e as gotículas de água.

Fibra	Valor do ângulo de contato ($\bar{x}$)
PMMA	146±1,4 ^{a,c}
PCL	152±0,8 ^a
Blenda F8	147±6,4 ^{a,c}
PMMA-NIM (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>)	125±0,8 ^{b,d}
PMMA (<i>core</i>) / PCL-NIM (<i>sheath</i>)	122±2,6 ^{c,d}

5.1.2 Caracterização da propriedade de barreira: permeabilidade ao vapor de água

O ensaio de permeabilidade ao vapor de água foi realizado com o objetivo de corroborar os resultados obtidos para os valores mais baixos de ângulo de contato encontrados para as fibras coaxiais em comparação as fibras monoaxiais uma vez que esse ensaio pode demonstrar- além das propriedades próprias dos polímeros formadores da matriz- as interações que estes podem realizar, bem como alterações de porosidade, espaçamento ou arranjo das fibras poliméricas. Os valores encontrados de permeabilidade ao vapor d'água (PVD) para as fibras coaxiais foram mais altos que para as fibras monoaxiais como mostrado na Tabela 5.2. Este fato corrobora os dados de menores ângulos de contato para estas fibras, indicando uma maior

hidrofilicidade para as mesmas que, associado aos maiores diâmetros das fibras podem indicar maiores espaçamentos na matriz resultando em maiores valores de permeabilidade.

Tabela 5.2. Valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e desvio padrão (DP) para as fibras obtidas por eletrofição.

Fibra	Espessura média (mm)	PVA (g.mm/h.m ² .Pa)	Desvio Padrão (DP)
PMMA puro	0,3367 ^a	3,93*10 ^{-5 a}	3,18*10 ⁻⁶
PCL puro	0,3367 ^b	6,84*10 ^{-5 a}	6,42*10 ⁻⁶
Blenda F8	0,3367 ^b	3,28*10 ^{-5 a}	2,21*10 ⁻⁷
PMMA-NIM (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>)	0,3367 ^{a,c}	1,39*10 ^{-4 b}	0,13*10 ⁻⁴
PMMA (<i>core</i>) / PCL-NIM (<i>sheath</i>)	0,3367 ^c	1,25*10 ^{-4 b}	0,04*10 ⁻⁴

5.1.3 Caracterização das fibras coaxiais obtidas por eletrofição através de FTIR-ATR

As fibras foram caracterizadas por FTIR-ATR para verificar a presença das bandas características dos dois polímeros formadores e a presença do fármaco Nimesulida, quando adicionado. As principais bandas referentes aos polímeros e ao fármaco estão apresentadas nos espectros de FTIR-ATR da Figura 5.4. Não foram observadas diferenças significativas entre as fibras do mesmo modo que observado para as fibras uniaxiais, nem com a presença do fármaco e nem mesmo apesar do aumento da concentração de PCL. Este fato pode estar associado a semelhança na constituição química dos dois polímeros (apresentando modos vibracionais muito semelhantes) e a baixa concentração do fármaco, que por sua vez pode estar disperso no interior da fibra e não ser muito identificado pelo método de refletância atenuada.

A vibração de estiramento associada ao grupamento C=O dos polímeros individuais PMMA e PCL, foi observada em torno de 1724 e 1723 cm⁻¹ respectivamente e a banda associada ao estiramento a ligação C-O em torno de 1140 cm⁻¹ para PMMA e 1164 cm⁻¹ para PCL. As vibrações de estiramento dos grupos CH₂ foram observadas nas regiões de 2949-2845 cm⁻¹ e as deformações em 1472-1430 cm⁻¹. Observa-se que a vibração de estiramento para o grupo -CH₃ presente no polímero PMMA, aparece em 3006 cm⁻¹ e é ausente nas fibras coaxiais, apesar da presença do polímero na solução eletrofiada. Esse fato pode indicar que a parte superficial da fibra é formada pelo polímero PCL, sugerindo a obtenção das fibras *core-sheath*, uma vez que a técnica ATR é mais superficial, podendo atingir uma profundidade de penetração

da luz infravermelha em cerca de 2 micrômetros. A vibração característica do grupo N-H para o fármaco Nimesulida foi observada em 3279 cm^{-1} e o mesmo sinal não foi observado nas fibras coaxiais provavelmente devido à baixa concentração. Para as fibras coaxiais não foram observadas diferenças significativas e nem mesmo a formação de novas bandas, fato que sugere a integridade dos polímeros mesmo após o processo de eletrofiação.

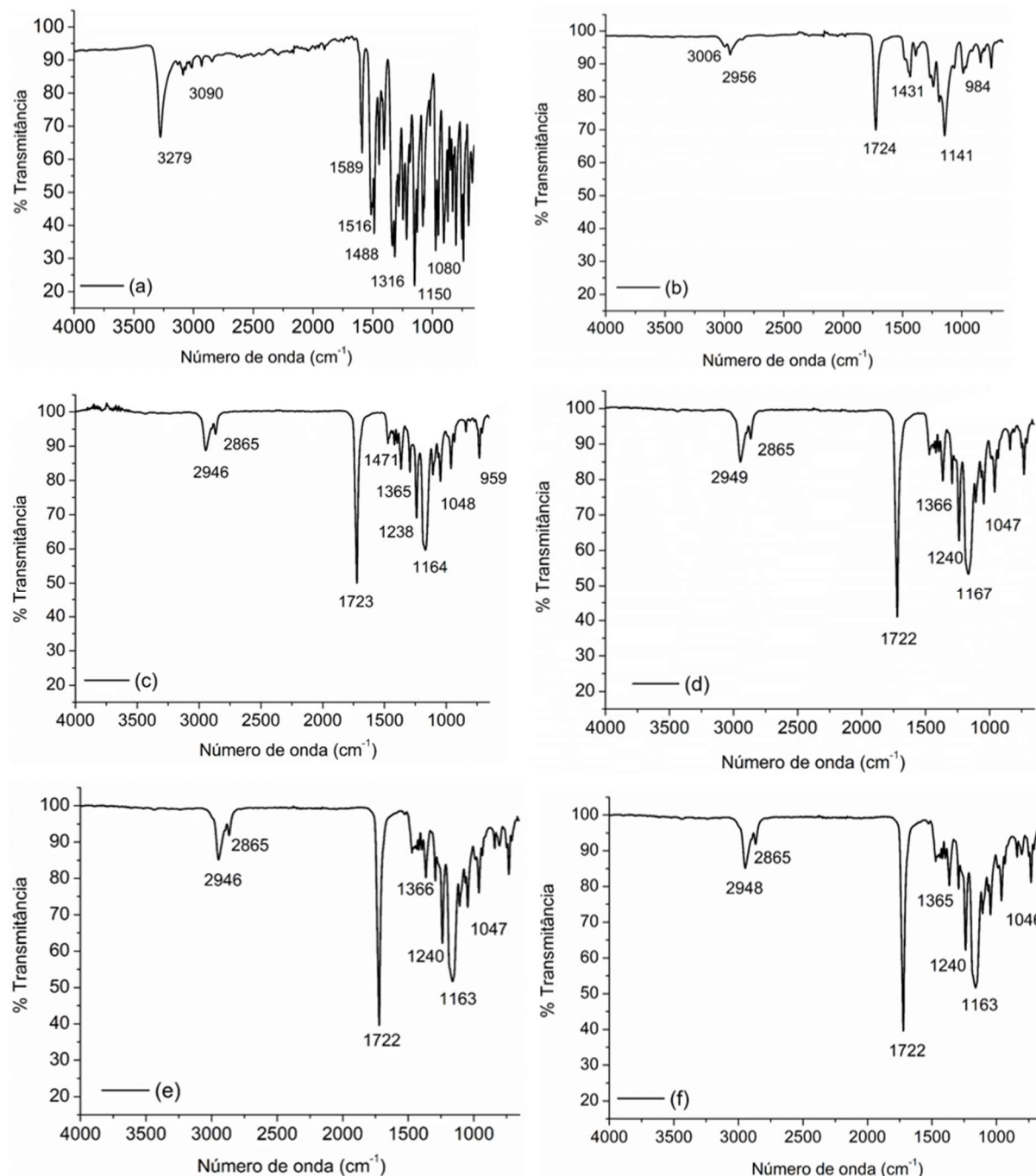


Figura 5.4. Espectro FTIR-ATR ampliado na região de 4000 a 900 cm^{-1} ; a) fármaco Nimesulida; b) Fibra de PMMA 12 % m/v; c) Fibra de PCL 32 % m/v; d) Fibra coaxial PMMA (*core*) /PCL (*sheath*) sem fármaco; e) Fibra coaxial PMMA (*core*) /PCL-NIM(*sheath*); f) Fibra coaxial PMMA-NIM(*core*) /PCL (*sheath*).

5.1.4 Caracterização das fibras coaxiais obtidas por eletrofiação através das técnicas de TG e DSC

As fibras coaxiais foram analisadas também por Termogravimetria (TG) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), esperando-se nesse caso a presença dos mesmos eventos de degradação anteriormente citados para os polímeros (discussão das fibras uniaxiais), além da observação de que o processo de eletrofiação formando as fibras coaxiais não altera as propriedades térmicas dos polímeros formadores e nem mesmo do fármaco. A Figura 5.5 mostra os termogramas derivativos (dTG) obtidos para as fibras.

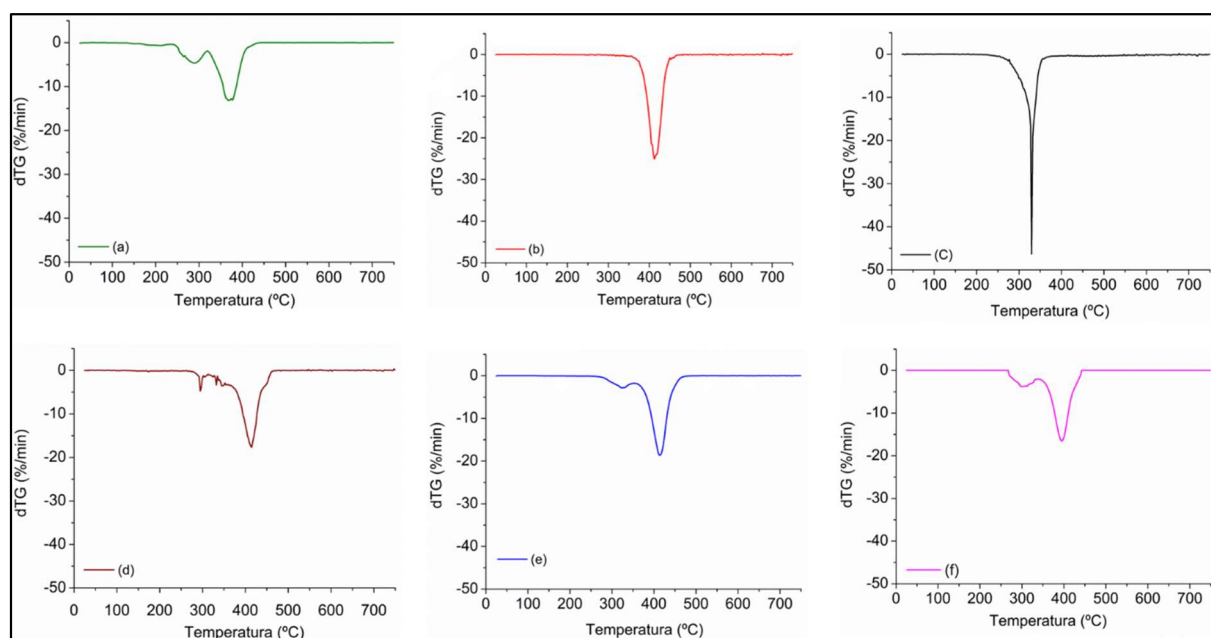


Figura 5.5. Curvas dTG para as fibras na faixa de 37-700 °C ; a) Fibra de PMMA 12 % m/v; b) Fibra de PCL 32 % m/v; c) fármaco Nimesulida; d) Fibra coaxial PMMA (*core*) /PCL (*sheath*) sem fármaco; e) Fibra coaxial PMMA (*core*)/PCL-NIM(*sheath*); f) Fibra coaxial PMMA-NIM(*core*)/PCL (*sheath*).

A partir da análise dos termogramas obtidos para as fibras coaxiais, pode-se perceber a degradação térmica do polímero PMMA como resultado dos dois eventos típicos relatados anteriormente: a cisão homolítica da cadeia (em temperaturas mais baixas) e o segundo como a clivagem dos monômeros gerando radicais em temperaturas próximas a 300-400 °C (ALI, UMAR; KARIM; BUANG, 2015; CARRIZALES *et al.*, 2008; FERRIOL; GENTILHOMME; COCHEZ, 2003). Nota-se que o processo de eletrofiação para a formação das fibras coaxiais não altera a degradação térmica dos polímeros, não os tornando termicamente desfavoráveis à sua aplicação, fato que também foi comprovado pela análise do termograma para o polímero PCL e para o fármaco Nimesulida, com eventos de degradação próximos a 410 e 320 °C

(GÁLICO *et al.*, 2014; HADJ-HAMOU; METREF; YAHIAOUI, 2017; RUSECKAITE; JIMÉNEZ, 2003). Para as fibras coaxiais, é possível observar que na fibra formada por PMMA (*core*) e PCL (*sheath*) sem o fármaco Nimesulida, a degradação inicial a mais baixa temperatura (referente à degradação inicial do polímero PMMA) ocorreu em temperaturas um pouco mais elevada que para a fibra uniaxial, 294 e 287 °C, respectivamente. O mesmo resultado foi observado para as fibras contendo o fármaco Nimesulida, fato que pode indicar uma possível proteção térmica por parte do polímero formador externo à fibra coaxial (PCL) ou até mesmo interações entre os polímeros ou dos mesmos com o fármaco Nimesulida, proposta que foi corroborada com as análises de DSC.

Nas análises de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) conforme termogramas presentes na Figura 5.6, pode-se avaliar as transições vítreas e/ou temperatura de fusão dos polímeros PMMA/PCL conforme descrito anteriormente para as fibras uniaxiais. A temperatura de transição vítrea (Tg) para PMMA (polímero amorfo) na fibra coaxial sem a presença do fármaco Nimesulida foi de 132 °C, sendo este valor um pouco diferente do encontrado para o polímero nas fibras uniaxiais de PMMA (110°C). Esta diferença no valor de Tg sugere a presença de forças intermoleculares entre PMMA e PCL, uma vez que a transição vítrea de PMMA na presença de PCL necessita de uma maior quantidade de calor para sua ocorrência. Para as fibras coaxiais, a presença do fármaco Nimesulida na parte externa da fibra, ou seja, juntamente com PCL, elevou o valor de Tg do PMMA para 131 °C, enquanto a presença do fármaco juntamente com PMMA na parte interna da fibra torna o valor de Tg do polímero mais baixo, igual a 105 °C. O abaixamento no valor da temperatura para a transição vítrea do PMMA na presença do fármaco Nimesulida, sugere um aumento na mobilidade das cadeias poliméricas, resultado da diminuição de forças intermoleculares: a presença do fármaco com seu grupo polare sulfonamida pode sugerir uma interrupção nas interações hidrófobas predominantes na matriz de PMMA, levando a uma maior mobilidade das cadeias poliméricas e diminuindo o valor de Tg. Tal fato é relatado na literatura, para adição de compósitos à matriz polimérica (LIU, H. *et al.*, 2010). Adicionalmente, também pode ser observado, que o fato de que nenhum pico endotérmico isolado próximo a 150 °C foi observado para os termogramas das fibras coaxiais sugere que a droga não está presente nas fibras em sua forma cristalina isolada (HUERTA; ABERTURAS; MOLPECERES, 2015) mas sim dispersa em toda a matriz polimérica conforme esperado pelo processo de eletrofiação para uniformidade do sistema.

A temperatura de fusão (Tm) para PCL, polímero semicristalino, não apresentou diferenças significativas nos dois tipos de fibras coaxiais: o valor de Tm encontrado para a fibra uniaxial de PCL foi de 60 °C e para a fibra coaxial sem o fármaco este valor foi de 61 °C.

Valores similares (60 °C) foram encontrados para as fibras na conformação *core-sheath* (tanto com Nimesulida localizada na parte interna ou externa da fibra coaxial).

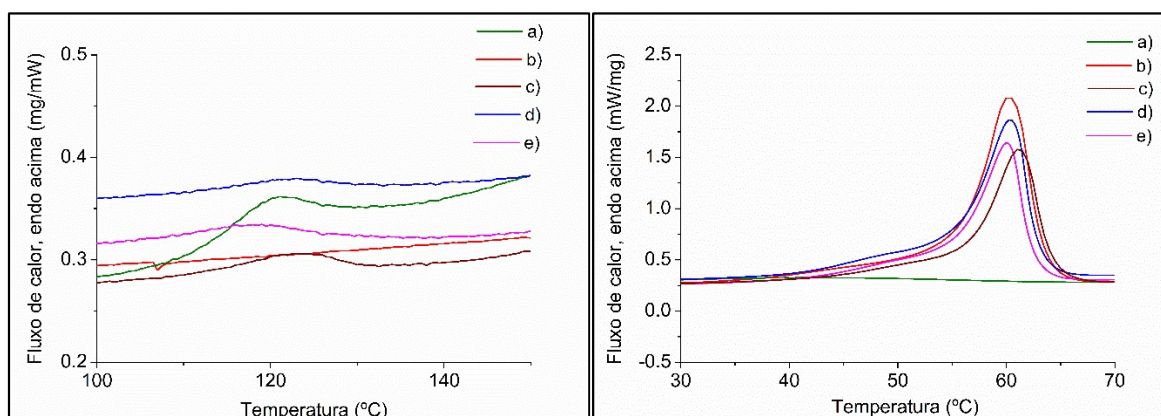


Figura 5.6. Termogramas de análise calorimétrica diferencial para: a) Nimesulida; b) Fibra de PCL; c) Fibra coaxial PMMA (*core*) /PCL (*sheath*) sem fármaco; d) Fibra coaxial PMMA-NIM (*core*) /PCL (*sheath*); e) Fibra coaxial PMMA (*core*) /PCL-NIM (*sheath*); f) fibra de PMMA. Lado esquerdo: expansão para região característica da Tg de PMMA. Lado direito: expansão para região característica da Tm de PCL.

5.1.5 Caracterização mecânica das fibras coaxiais: Ensaio de resistência à ruptura em texturometro

O ensaio de resistência à ruptura em texturômetro para as fibras com conformação *core-sheath* foi realizado a fim de se investigar a capacidade das fibras coaxiais em resistir a ruptura quando aplicada uma força. Os parâmetros investigados foram os mesmos que para as blendas de PMMA/PCL: resistência à perfuração (Rp) e alongamento na ruptura (Eb). Baseado nos resultados apresentados na Tabela 5.3 é possível se observar que para as fibras na conformação *core-sheath* foram cerca de 25 vezes maiores que o mesmo valor encontrado para a fibra de PMMA puro, como esperado através das boas propriedades mecânicas relatadas na literatura para PCL (SUWANTONG, ORAWAN, 2016) do mesmo modo que observado para as blendas.

Tabela 5.3 Valores de Rp e Eb obtidos do ensaio em texturômetro para as fibras coaxiais obtidas por eletrofiação.

Fibras	Rp (MPa)	Eb (%)
PMMA	0.099 ± 0.03^a	0.125 ± 0.03^a
PCL	0.662 ± 0.21^b	11.039 ± 2.22^b
PMMA-NIM (<i>core</i>) / PCL (<i>sheath</i>)	0.279 ± 0.03^a	$2.943 \pm 0.32^{a,c}$
PMMA (<i>core</i>) / PCL-NIM (<i>sheath</i>)	0.242 ± 0.02^a	3.450 ± 0.92^c

5.1.6 Caracterização do sistema de liberação *in vitro*: liberação tipo Franz Cell para o fármaco Nimesulida

Primeiramente foi obtida uma curva de calibração para o fármaco Nimesulida em HPLC, utilizando como C8 como coluna cromatográfica, como explicitado na sessão “materiais e métodos”. A curva de calibração do fármaco se encontra na Figura 5.7.

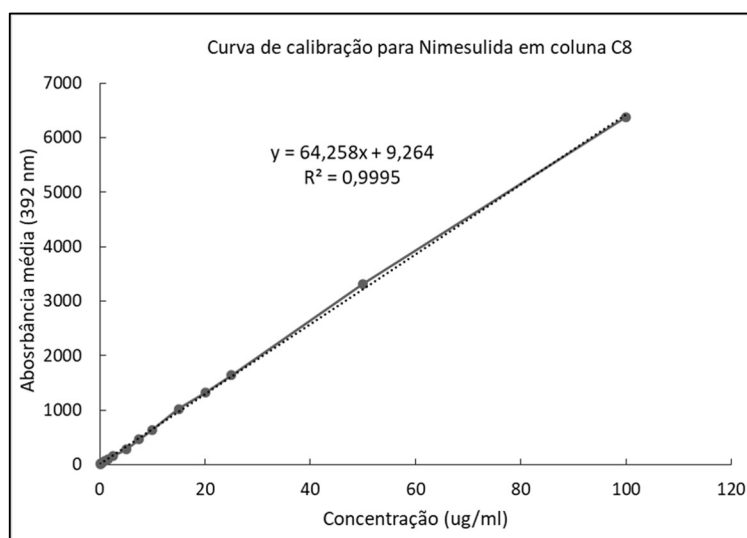


Figura 5.7. Representação da curva de calibração obtida para Nimesulida em HPCL sob coluna C8 e fase móvel acetonitrila/tampão PBS 1:1.

O perfil de liberação do fármaco Nimesulida nas fibras em conformação *core-sheath* obtidas, foram avaliados através do ensaio de liberação tipo Franz Cell. A liberação do fármaco quando este é localizado na parte externa (*sheath*) foi mais rápida que para a fibra com Nimesulida localizada na parte interna (*core*), como já esperado devido a uma maior facilidade de liberação do fármaco quando em maior contato com o meio de liberação. Adicionalmente a este fato, alguns autores reportam que a transição vítrea dos polímeros formadores dos sistemas de liberação de fármacos, podem influenciar na entrega dos mesmos: quando o fármaco é localizado junto a polímeros como PCL que apresentam um baixo valor de Tg ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), a liberação pode ser mais rápida e apresentar uma maior explosão inicial quando comparada a presença de polímeros com altos valores de Tg. A explicação deste fato pode estar associada ao efeito do estado borrachoso (*rubbery state*) para este tipo de polímero, que se encontra acima de seu valor de Tg à temperatura ambiente. Este estado, menos rígido, pode promover uma menor inserção do fármaco nos poros das fibras, deixando mais superficial e em menor interação com o polímero, sendo liberado mais facilmente. Associado a este efeito também é

relatado que fármacos associados a polímeros que na temperatura ambiente se encontram acima do seu valor de Tg exibem um perfil de difusão cinética que obedece a lei de Fick e fármacos associados a polímeros que na temperatura ambiente estão abaixo de seu valor de Tg exibem uma liberação tempo dependente que não obedece a lei de Fick, uma vez que as cadeias poliméricas precisam se rearranjar para receberem o meio de difusão do fármaco e assim libera-lo (TAN; THOMAS, 2016)(ZUPANČIČ *et al.*, 2016)(SIMÕES *et al.*, 2019).

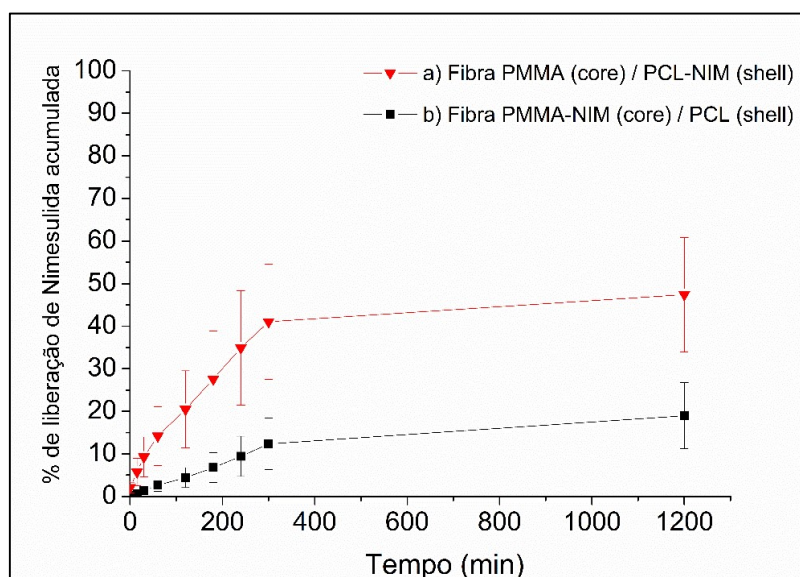


Figura 5.8. Representação da curva de liberação do fármaco Nimesulida em porcentagem acumulada de liberação *versus* tempo para as fibras coaxiais.

Fonte: SIMÕES, MARIA CECILIA RODRIGUES, et.al. Journal of the Materials Science, v.54, n.7, 2019.

CÁPITULO 6

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos para os polímeros sintetizados e para as fibras formadas, é possível concluir que sistemas a base de polimetilmetacrilato, policaprolactona e polímeros de acilhidrazonas podem ser obtidos com sucesso como blends poliméricas através da técnica de eletrofiação.

De maneira específica, a síntese das poliacilhidrazonas **5A** e **5B** através do acoplamento de dihidrazidas com dialdeídos, se mostrou eficiente na formação destes polímeros e técnicas como RMN uni e bidimensionais foram úteis na caracterização destas estruturas. Apenas o polímero **5B** pode ser associado à PMMA na forma de fibra polimérica obtida por eletrofiação, uma vez que o polímero **5A** se apresentou como um filme insolúvel nos solventes usuais para a técnica. Devido à baixa solubilidade dos polímeros formados, não se pôde chegar à conclusão de sua obtenção na forma polimérica ou oligomérica, porém os dados revelaram um padrão de repetição que sugere a repetição de seus monômeros caracterizados. Quanto aos intermediários desses polímeros, as hidrazidas **3a** e **3b** ainda foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade revelando baixa toxicidade e alta viabilidade celular, fato que permitiu a análise destas hidrazidas intermediárias quanto ao perfil anti-inflamatório. O método utilizado foi o de inibição da desnaturação proteica de albumina, e estas hidrazidas se revelaram moléculas com um potencial perfil de inibição de desnaturação e assim um potencial perfil anti-inflamatorio que poderá ser avaliado posteriormente na construção de novas moléculas com este arcabouço molecular.

A fibra formada da associação de PMMA-**5B** se mostrou uniforme, sem a presença de poros ou rachaduras, sendo que a presença da poliacilhidrazona na fibra de PMMA a tornou mais hidrofílica e mais resistente à degradação térmica, fato associado à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre o grupamento –NH da acilhidrazona e os grupamentos terminais éster do PMMA. Em relação às suas propriedades mecânicas, a associação de **5B** à fibra de PMMA tornou a fibra menos resistente à deformação, com base no ensaio termomecânico TMA, apresentando menor módulo de Young do que a fibra de PMMA puro. Este fato pode ser associado a interação poliacilhidrazona-polímero que diminui as interações polímero-polímero resultando em espaços livres na matriz polimérica, e com isso em menor resistência à deformação.

Em relação as blends entre PMMA e PCL, pode-se notar que a associação destes polímeros por eletrofiação é um meio útil para a obtenção de fibras uniformes e com

características térmicas, superficiais e mecânicas intermediárias entre os dois polímeros. As fibras formadas entre PMMA em proporção fixa de 12% m/v e incrementos de 6, 12 e 21% m/m de PCL demonstraram boa estabilidade térmica analisada pelas técnicas de TG/dTG e DSC, mostrando que a inserção de PCL à matriz de PMMA não reduz sua estabilidade térmica. A análise dos ângulos de contato entre a gotícula de água e a superfície das fibras demonstraram uma pequena redução no ângulo na presença de PCL. A análise mecânica TMA para as fibras de associação PMMA e PCL mostraram um aumento da deformação para as blendas comparado às fibras de PMMA puras, mostrando que a adição de PCL à matriz produz melhora nas propriedades mecânicas das blendas. Este fato pode estar associado a formação de redes poliméricas mais fortes devido as interações entre as cadeias dos polímeros, que deformam menos frente à tensão aplicada. No ensaio de permeabilidade ao vapor de água, a blenda com concentração de 12% m/m de PCL foi a única que se mostrou significativamente diferente das demais, apresentando maior valor de permeabilidade ao vapor d'água, podendo sugerir que esta seja a melhor fibra na escolha de futuros testes de liberação de fármacos.

A associação do fármaco Nimesulida às fibras anteriormente descritas também foi obtida com sucesso e demonstrou que a presença do fármaco não altera a homogeneidade da fibra como observado pelas análises térmicas. A análise termomecânica TMA demonstrou uma redução da propriedade mecânica de resistência a deformação quando comparada as blendas sem fármaco. Este fato foi associado a interação polímero-fármaco, que também foi observada no ensaio de permeabilidade ao vapor d'água demonstrando maior poder de barreira nessas fibras. Por fim, o ensaio prévio de liberação *in vitro* para o fármaco Nimesulida a partir das blendas de PMMA e PCL mostrou uma liberação lenta (de até 36 dias) que pode ser atribuída a característica hidrofóbica dos polímeros constituintes da fibra, mostrando que as fibras descritas neste trabalho podem atuar como sistemas de liberação controlada de medicamentos. Porém, ensaios posteriores como a quantificação do fármaco nessas matrizes e ensaios de liberação visando a forma de apresentação das mesmas devem ser efetuados.

As fibras coaxiais dos polímeros PMMA e PCL demonstraram, do mesmo modo que para as blendas, melhora nas propriedades mecânicas sendo ainda melhores que as blendas em proporções semelhantes de PCL e apresentando melhores resultados quanto à permeabilidade ao vapor d'água e ângulo de contato. Além disso, as fibras coaxiais apresentaram a liberação controlada do fármaco Nimesulida sendo que esta liberação mostrou-se ocorrer sob difusão do fármaco da matriz obedecendo a lei de Fick, sendo condizente com os resultados prévios da literatura que sugerem esse tipo de liberação para fármacos a partir de matrizes com longo tempo de degradação como PMMA e PCL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AHMED, F. E.; LALIA, B. S.; HASHAIKEH, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. **Desalination**, v. 356, p. 15–30 , 2015.

AKHGARI, A. *et al.* Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 28, p. 307–314 , 2006.

ALI, U.; KARIM, K. J. A.; BUANG, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). **Polymer Reviews**, v. 55, n. 4, p. 678–705 , 2015.

ALI, Umar; KARIM, Khairil Juhanni Bt Abd; BUANG, Nor Aziah. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). **Polymer Reviews** v. 55, n. 4, p. 678–705 , 2015.

BAJI, A. *et al.* Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 5, p. 703–718, 2010.

BANERJEE, M. *et al.* Surface treatment of cellulose fibers with methylmethacrylate for enhanced properties of in situ polymerized PMMA/cellulose composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 2, p. 1–9 , 2014.

BARREIRO, Eliezer J. *et al.* A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129–148 , 2002.

BERTUZZI, M.A. *et al.* Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 972–978 , 2007.

BETTENCOURT, A. Poly (methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. **Journal of Microencapsulation** v. 29, n. 4, p. 353–367 , 2012.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347 , 2010.

BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 21–33 , 2014.

BONADIES, Irene *et al.* Electrospun core/shell nanofibers as designed devices for efficient Artemisinin delivery. **European Polymer Journal** v. 89, n. February, p. 211–220 , 2017.

BONFIM, André Luís Bathista e Silva. **Estudo da dinâmica molecular em copolímeros em bloco compostos de poli(metacrilato de metila), poli(ácido acrílico) e poli(acrilato de chumbo) por técnicas de ressonância magnética nuclear e análise térmica.** Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009. 132 p.

BUFFETEAU, T.; DESBAT, B.; EYQUEM, D. Attenuated total reflection Fourier transform infrared microspectroscopy: Theory and application to polymer samples. **Vibrational Spectroscopy**, v. 11, p. 29–36 , 1995.

BURGESSON, J. R. *et al.* Lead optimization of an acylhydrazone scaffold possessing antiviral activity against Lassa virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 21, p. 5840–5843 , 2013.

CACHIBA, T. H. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1566–1569 , 2012.

CARAMELLA, C. *et al.* Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 206–228 , 2015.

CARRIZALES, C. *et al.* Thermal and mechanical properties of electrospun PMMA, PVC, Nylon 6, and Nylon 6,6. **Polymer for advanced technologies** v. 19, p. 124–130 , 2008.

CARVALHO, R.A *et al.* The potential of TEMPO-oxidized nanofibrillar cellulose beads for cell delivery applications. **Cellulose** p. 1–7 , 2016.

CASTILLO-ORTEGA, M. M. *et al.* Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. **Materials Science and Engineering C** v. 31, n. 8, p. 1772–1778 , 2011.

CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. **Biomaterials**, v. 14, n. 12, p. 939–944 , 1993.

CHOU, S. F.; CARSON, D.; WOODROW, K. A. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 584–591 , 2015.

CICHA, I. *et al.* Nano-biomaterials for cardiovascular applications: Clinical perspective.

Journal of Controlled Release, v. 229, p. 23–36 , 2016.

CILURZO, F. *et al.* Design and characterization of an adhesive matrix based on a poly(ethyl acrylate, methyl methacrylate). **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 3, p. 748–54 , 2008.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. Tese de doutorado. Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2010. 268 p.

COSTA, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de polímeros em solução Parte I : Fundamentação Teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177 , 2012.

CUNHA, A. C. *et al.* Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 2051–2059 , 2003.

DE MELO, T. R. F. *et al.* Pharmacological evaluation and preparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing an N-acyl hydrazone subunit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 5821–5837 , 2014.

DE PAOLI, M.A. **Degradação e estabilização de polímeros**. 1ª ed. São Paulo: Artliber, 2009. 286 p. .

DINARELLO, Charles A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell** v. 140, n. 6, p. 935–950 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.043>>.00928674.

DONG, H. *et al.* Cellulose nanocrystals is a reinforcing material for electrospun poly(methylmethacrylate) fibers: Formation, properties and nanomechanical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2488–2495 , 2012.

DUARTE, C. D. *et al.* Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 2421–2433 , 2007.

EBELEWE, R. O. **Polymer Science and Technology**. New York: CRC PRESS, 2000. 483 p.

ERBAS, E. *et al.* Preparation and characterization of transparent PMMA – cellulose-based

nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 381–389 , 2015.

FENTON, Owen S. *et al.* Advances in Biomaterials for Drug Delivery. **Advanced Materials** v. 30, n. 29, p. 1–29 , 2018.

FERRIOL, M; GENTILHOMME, A; COCHEZ, M. Thermal degradation of poly (methyl methacrylate)(PMMA): modelling of DTG and TG curves. **Polymer Degradation and Stability** v. 79, p. 271–281 , 2003.

FIGUEIREDO, W.L.M; ALVES, T. C. A. Uso dos anti-inflamatorios nao esteroides no controle da dor aguda: Revisao sistematica. **Revista Neurociencias** v. 23, n. 3, p. 463–467 , 2015.

FINOTTI, P. F. M. **Estudo do comportamento mecânico e biocompatibilidade de blendas de PLA/PCL compatibilizadas e não compatibilizadas**. Dissertação de mestrado. Departamento de engenharia de materiais e manufatura, Universidade de São Paulo, 2014. 201 p.

FORMHALS, A. *Process and apparatus for preparing artificial threads* . Alemanha: 1975504. , 1934

FOSTER, P.L. *et al.* Highly luminescent polycaprolactone films doped with diaquatris (thenoyltrifluoroacetate) europium (III) complex. **Journal of Luminescence**, v. 167, p. 85–90 , 2015.

FRANK, D. *et al.* Polymethyl-methacrylate-sorbitol-based capsules as local drug delivery vehicles: a preliminary study. **Cell Biology International**, v. 35, n. 5, p. 499–504 , 2011.

GÁLICO, P.A. *et al.* Thermoanalytical study of Nimesulide and their recrystallization products obtained from solutions of several alcohols. **Journal of thermal analysis caloimetric**, v. 115, p. 2385–2390 , 2014.

GAUTAM, R. *et al.* Review Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. **Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 5, p. 1444–1450 , 2012.

GHANBARZADEH, B. *et al.* Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 1191–1197 , 2007.

GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 209–215 , 2008.

GHAVIMI, S. A. *et al.* Polycaprolactone/starch composite: fabrication, structure, properties and applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 103, n. 7, p. 2482–2498 , 2014.

GÖKE, Katrin *et al.* Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 126, p. 40–56 , 2018.

GRABBERT, N. *et al.* Mechanical Properties of Individual Composite Poly(methyl-methacrylate)-Multiwalled Carbon Nanotubes Nanofibers. **Materials science & engineering**, v. 64, p. 1–6 , 2014.

GREINER, A; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. **Angewandte Chemie - International Edition** v. 46, n. 30, p. 5670–5703 , 2007.

GUPTA, P. *et al.* Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. **Polymer**, v. 46, p. 4799–4810 , 2005.

HADJ-HAMOU, A.S.; METREF, F.; YAHIAOUI, F. *Thermal stability and decomposition kinetic studies of antimicrobial PCL/nanoclay packing films* . [S.l: s.n.] . , 2017

HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A.C.; KARISSON, S. Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo and copolymers of PLA and PGA. **Polymer degradation and stability**, v. 52, p. 283–291 , 1996.

HARDY, J. G. *et al.* Generation of metallosupramolecular polymer gels from multiply functionalized grid-type complexes. **New Journal of Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 668–673 , 2012.

HEINY, M.; SHASTRI, V. P. Nanofibers of Elastin and Hydrophilic Segmented Polyurethane Solution Blends Show Enhanced Mechanical Properties through Intermolecular Protein-Polymer H Bonding. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 4, p. 1312–1320 , 2016.

HIRSCH, A. K.H.; BUHLER, E.; LEHN, J. M. Biodynamers: Self-organization-driven formation of doubly dynamic proteoids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 9, p. 4177–4183 , 2012.

HU, X. *et al.* Photo-triggered release of caged camptothecin prodrugs from dually responsive shell cross-linked micelles. **Macromolecules**, v. 46, n. 15, p. 6243–6256 , 2013.

HUANG, Z. M. *et al.* A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 15, p. 2223–2253 , 2003.

HUERTA, Concepción; ABERTURAS, María del Rosario; MOLPECERES, Jesús. Nimesulide-loaded nanoparticles for the potential coadjuvant treatment of prostate cancer. **International Journal of Pharmaceutics** v. 493, n. 1–2, p. 152–160 , 2015.

JAWOREK, A.; SOBCZYK, A. T. Electrospaying route to nanotechnology: An overview. **Journal of Electrostatics**, v. 66, p. 197–219 , 2008.

JEON, O. H.; ELISSEEFF, J. Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 2, p. 105–120 , 2016.

JIN, Y. *et al.* Recent advances in dynamic covalent chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6634–6654 , 2013.

JOSHI, M. K. *et al.* In Situ Generation of Cellulose Nanocrystals in Polycaprolactone Nanofibers: Effects on Crystallinity, Mechanical Strength, Biocompatibility, and Biomimetic Mineralization. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 35, p. 19672–19683 , 2015.

JULIO, S. R.; GALLARDO, A.; LEVENFELD, B. Polymeric Drug Delivery Systems. **Advanced Materials**, v. 7, n. 2, p. 203–208 , 1995.

KAMALY, N. *et al.* Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663 , 2016.

KAMPEERAPAPPUN, Piyaporn. The electrospun polyhydroxybutyrate fibers reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 20, p. 1–7 , 2016.

KANJICKAL, D. G.; LOPINA, S. T. Modeling of Drug Release from Polymeric Delivery

Systems — A Review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 21, n. 5, p. 345–386 , 2004.

KASSUYA, C.A.L; PIORNEDO, R.R. Processo Inflamatorio e importancia. **Aspectos gerais da inflamação e da dor**. [S.l.]: Universidade Federal da Grande Dourados, 2013. p. 11–20.

KHALF, Abdurizzagh; MADIHALLY, Sundararajan V. Recent advances in multiaxial electrospinning for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 112, p. 1–17 , 2017.

KIM, H. C. *et al.* Electrospun nanofibrous PVDF-PMMA MF membrane in laboratory and pilot-scale study treating wastewater from Seoul Zoo. **Desalination**, v. 346, p. 107–114 , 2014.

KUMARI, C Sree *et al.* Invitro Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Property of Rhizopora uchronata Leaves. **International Journal of Pharma Sciences and Research** v. 6, n. 3, p. 482–485 , 2015.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504 , 2009.

LEHN, J. M. Perspectives in chemistry - Aspects of adaptive chemistry and materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 11, p. 3276–3289 , 2015.

LEHN, J. M. PL – 1 Perspectives in chemistry from supramolecular chemistry towards adaptive chemistry. **FEBS Journal**, v. 280, n. 1, p. 1–2 , 2013.

LEHN, J. M. Supramolecular polymer chemistry - Scope and perspective. **Polymer International**, v. 51, n. 10, p. 825–839 , 2002.

LEHN, J.M. Dynamers: Dynamic molecular and supramolecular polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 814–831 , 2005.

LEHN, J.M. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 36, p. 151–160 , 2007.

LEHN, J.M. Supramolecular Polymer Chemistry. **Macromolecular Symposia**, n. 1, p. 5–6 , 2001.

LIMA, A.M.F. *et al.* Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia da absorção de água e propriedades mecânicas em filmes de alginato de sódio.

Quimica Nova, v. 30, n. 4, p. 832–837 , 2007.

LIN, Hong-Ru *et al.* Hollow, pH-Sensitive Calcium–Alginate/Poly(acrylic acid) Hydrogel Beads as Drug Carriers for Vancomycin Release. **Journal of Applied Polymer Science** v. 118, p. 1878–1886 , 2010.

LIN, R.; CUI, H. Supramolecular nanostructures as drug carriers. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 7, p. 75–83 , 2015.

LIU, H. *et al.* Fabrication and properties of transparent polymethylmethacrylate/cellulose nanocrystals composites. **Bioresource Technology** v. 101, p. 5685–5692 , 2010.

LIU, J.; KUMAR, S. Microscopic polymer cups by electrospinning. **Polymer**, v. 46, n. 10, p. 3211–3214 , 2005.

LIU, Xuemei *et al.* A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 97, n. June, p. 24–32 , 2018.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154 , 2005.

LU, Yang *et al.* Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology** v. 8, n. 5, p. 654–677 , 2016.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros: determinação do peso molecular e análise térmica**. 1º ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2001. 366 p. .

MA, D.; MCHUGH, A. J. The interplay of phase inversion and membrane formation in the drug release characteristics of a membrane-based delivery system. **Journal of Membrane Science**, v. 298, n. 1–2, p. 156–168 , 2007.

MANADAS, R; EUGÉNIA, M; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375–399 , 2002.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. São Paulo: Blucher, 1999. 191 p. .

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos : fundamentos , aplicações , aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. Tese de doutorado. FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2003. 127 p.

MARK, James E. **Physical Properties of Polymers Handbook**. 2^a edition ed. [S.l.]: Springer: NY, 2007. 3-8 p.

MASSARICO SERAFIM, Ricardo Augusto *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 418–425 , 2014.

MCNEIL, Sarah E; GRIFFITHS, Helen R; PERRIE, Yvonne. Polycaprolactone Fibres as a Potential Delivery System for Collagen to Support Bone Regeneration. **Current Drug Delivery**, v. 8, n. 4, p. 448–455 , 2011.

MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell** v. 140, n. 6, p. 771–776 , 2010.1097-4172 (Electronic)n0092-8674 (Linking).

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature** v. 454, n. 7203, p. 428–435 , 2008.1476-4687 (Electronic)r0028-0836 (Linking).

MICALI, N *et al.* Cyclodextrin nanoaggregates and their assembly with protein: a spectroscopic investigation. **Nanotechnology**, v. 17, n. 13, p. 3239–3244 , 2006.

MIZUSHIMA, Y.; KOBAYASHI, M. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 20, n. 3, p. 169–173 , 1968.

MONDAL, D.; GRIFFITH, M.; VENKATRAMAN, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, n. 5, p. 255–265 , 2016.

MORAWETZ, HERBERT. **Polymers: The origins and Growth of a Science**. 1^a ed. CANADA: DOVER PHENIX EDITIONS, 1985. 306 p. .

MOTHÉ, C.G; AZEVEDO, A.D. **Análise Térmica de Materiais**. 1^a ed. São Paulo: Artliber, 2009. 322 p. .

MUNJ, Hrishikesh Ramesh *et al.* Biocompatible electrospun polymer blends for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials** v. 102, n. 7, p. 1517–1527, 2014.

NAIR, R. *et al.* Influence of various drugs on the glass transition temperature of poly(vinylpyrrolidone): a thermodynamic and spectroscopic investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1, p. 83–96, 2001.

NAJAFI-TAHER, Roqiye *et al.* Preparation of an ascorbic acid/PVA–chitosan electrospun mat: a core/shell transdermal delivery system. **RSC Adv.** v. 5, n. 62, p. 50462–50469, 2015.

NARANG, R.; NARASIMHAN, B.; SHARMA, S. A Review on Biological Activities and Chemical Synthesis of Hydrazone Derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 569–612, 2012.

NGUYEN, Régis; HUC, Ivan. Optimizing the reversibility of hydrazone formation for dynamic combinatorial chemistry. **Chemical Communications**, n. 8, p. 942, 2003.

NGWULUKA, Ndidi. Application of in situ polymerization for design and development of oral drug delivery systems. **AAPS PharmSciTech** v. 11, n. 4, p. 1603–1611, 2010.

NICOLETTI, C. D.; PAULA, A.; FRASSON, Z. Formas de liberação controlada: Revisão bibliográfica e avaliação comparativa da qualidade de comprimidos Retard de Nifedipina 20 mg de referência e similar. **REVISTA CONTEXTO E SAÚDE**, v. 5, p. 65–74, 2006.

OH, K.; JEONG, K. S.; MOORE, J. S. m-Phenylene Ethynylene Sequences Joined by Imine Linkages: Dynamic Covalent Oligomers. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 22, p. 8397–8403, 2003.

OLIVEIRA, Michele F.; SUAREZ, Diego; ROCHA, Júlio César Barbosa; DE CARVALHO TEIXEIRA, Alvaro Vianna Novaes; CORTÉS, Maria E.; *et al.* Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. **Materials Science and Engineering C** v. 54, p. 252–261, 2015.

OLIVEIRA, R.B; LIMA, E.M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **REVISTA ELETRÔNICA DE FÁRMACIA**, v. 3, n. 1, p. 29–35, 2006.

ONO, T. *et al.* Soft-to-hard transformation of the mechanical properties of dynamic covalent polymers through component incorporation. **Chemical Communications**, n. 1, p. 46–48, 2003.

2007.

ONO, T; NOBORI, T; LEHN, J M. Dynamic polymer blends--component recombination between neat dynamic covalent polymers at room temperature. **Chemical Communications**, n. 12, p. 1522–1524 , 2005.

OSMAN, Nurul *et al.* In vitro Xanthine Oxidase (XO) and Albumin Denaturation Inhibition Assay of *Barringtonia racemosa* L. and Total Phenolic Content Analysis for Potential Anti-Inflammatory Use in Gouty Arthritis. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology** v. 5, n. 4, p. 343 , 2016.

OTERO-ESPINAR, F.J *et al.* Cyclodextrins in drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 289–301 , 2010.

PANTHI, G. *et al.* Electrospun polymeric nanofibers encapsulated with nanostructured materials and their applications: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 24, p. 1–13 , 2015.

PAUDEL, K.S. *et al.* Challenges and opportunities in dermal / transdermal delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 1, p. 109–131 , 2010.

PELIPENKO, J.; KOCBEK, P.; KRISTL, J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 484, n. 1, p. 57–74 , 2015.

RAJAMALLI, P.; PRASAD, E. Non-amphiphilic pyrene cored poly(aryl ether) dendron based gels: tunable morphology, unusual solvent effects on the emission and fluoride ion detection by the self-assembled superstructures. **Soft Matter**, v. 8, p. 8896 , 2012.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S.G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910–1939 , 2007.

RUSECKAITE, Roxana A.; JIMÉNEZ, Alfonso. Thermal degradation of mixtures of polycaprolactone with cellulose derivatives. **Polymer Degradation and Stability** v. 81, n. 2, p. 353–358 , 2003.

RUTLEDGE, G.C.; FRIDRIKH, S.V. Formation of fibers by electrospinning. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 14, p. 1384–1391 , 2007.

SAIN, S.; RAY, D.; MUKHOPADHYAY, A. Improved Mechanical and Moisture Resistance Property of In Situ Polymerized Transparent PMMA / Cellulose Composites. **Polymer Composites**, v. 36, n. 9, p. 1748–1758 , 2015.

SAKAT SACHIN, S; TUPE PREETI, N; JUVEKAR ARCHANA, R. Sakat et al . **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 2, p. 146–155 , 2010.0222414561.

SANPHUI, P.; SARMA, B.; NANGIA, A. Phase transformation in conformational polymorphs of Nimesulide. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 6, p. 2287–2299 , 2010.

SCHMIDT, B. V .K. J. *et al.* UV light and temperature responsive supramolecular ABA triblock copolymers via reversible cyclodextrin complexation. **Macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 1054–1065 , 2013.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials** v. 29, n. 13, p. 1989–2006 , 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 490 p. .

SIMÕES, Maria Cecília Rodrigues *et al.* The potential of electrospun poly(methyl methacrylate)/polycaprolactone core–sheath fibers for drug delivery applications. **Journal of Materials Science** v. 54, n. 7, p. 5712–5725 , 2019.

SINHA, V.R. *et al.* Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23 , 2004.

SKENE, W. G.; LEHN, J .M. Dynamers: polyacylhydrazone reversible covalent polymers, component exchange, and constitutional diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 22, p. 8270–8275 , 2004.

SKIBA, M. *et al.* Preparation and Characterization of Amorphous solid dispersions of Nimesulide in cyclodextrin copolymer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 4, p. 2772–2779 , 2014.

SOLLADIE, G.; ZIANICHERIF, C. Total Synthesis of Natural Gingerols, the 3 Active Principles of Ginger. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 2181–2185 , 1993.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHE, C. B. **Química Orgânica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013. 613 p. .

SPERLING, Laura E. *et al.* Advantages and challenges offered by biofunctional core-shell fiber systems for tissue engineering and drug delivery. **Drug Discovery Today** v. 21, n. 8, p. 1243–1256, 2016.

SUI, J.; YOUNG, A. B.; WHITTAL, R. M. Common Mass Spectrometry Contaminants and their Sources The contaminant information below is taken from " Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry " Bernd O . **Analitica Chimica Acta**, v. 627, n. 1, p. 71–81, 2008.

SUWANTONG, O. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. **Polymers Advanced Technologies**, v. 27, n. 10, p. 1264–1273, 2016.

SUWANTONG, Orawan. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. **Polymers for Advanced Technologies** v. 27, n. 10, p. 1264–1273, 2016.

TAN, B.; THOMAS, N. L. A review of the water barrier properties of polymer/clay and polymer/graphene nanocomposites. **Journal of Membrane Science** v. 514, p. 595–612, 2016.

TRIBUTINO, J. L. M. *et al.* Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1125–1131, 2009.

WANG, H. *et al.* Electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibers and microparticles. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 4, p. 1032–1038, 2010.

WANG, Q. *et al.* Doubly Hydrophilic Multiarm Hyperbranched Polymers with Acylhydrazone Linkages as Acid-Sensitive Drug Carriers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 11, p. 1553–1562, 2011.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

WU, M. *et al.* Optically transparent poly(methyl methacrylate) composite films reinforced with electrospun polyacrylonitrile nanofibers. **Journal of composite materials**, v. 46, n. 21, p. 2731–2738, 2012.

WUNDERLICH, B. The Basis of Thermal Analysis. **Thermal Characterization of Polymeric Materials**. 2^o ed. California: Academic Press, 1997. p. 206–472.

YU, K. *et al.* Interfacial welding of dynamic covalent network polymers. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 94, p. 1–17, 2016.

ZUPANČIČ, Špela *et al.* Long-Term Sustained Ciprofloxacin Release from PMMA and Hydrophilic Polymer Blended Nanofibers. **Molecular Pharmaceutics** v. 13, n. 1, p. 295–305, 2016.